



Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen

Neue Einblicke in die Heterogenität CD3 Antikörper induzierter T Lymphozyten Reaktionen

Inaugural Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. der Fakultät für Biologie
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von:

Janine Denise Dreesen
aus Duisburg

Juni 2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Anatomie der Universitätsklinik Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD. Dr. rer. nat. Bernhard B. Singer

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Ehrmann

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Wiebke Hansen

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2015

1 Inhalt

1	Einleitung	7
1.1	Das Immunsystem	7
1.1.1	Angeborenes und adaptives Immunsystem	7
1.2	T Lymphozyten.....	9
1.2.1	Signalvermittlung in T Lymphozyten	11
1.2.2	T Lymphozyten Aktivierung <i>in vitro</i>	12
1.3	Periphere mononukleäre Blutzellen.....	12
1.4	Monozyten	13
1.5	Zytokine.....	14
1.6	B Lymphozyten und Immunglobuline.....	16
1.7	Fc-Rezeptoren.....	18
1.7.1	CD32a Polymorphismus	19
1.8	Das Immunsystem und Krebs.....	20
1.8.1	Leukämie	20
1.8.2	Melanom.....	21
1.9	Mikrovesikel.....	23
1.10	CEACAMs.....	25
1.11	Zielsetzung der Arbeit	27
2	Material und Methoden.....	28
2.1	Geräte und Materialien	28
2.1.1	Geräte	28
2.1.2	Antikörper	29
2.1.3	Kommerzielle Reaktionssysteme	30
2.1.4	Chemikalien	31
2.1.5	Software	32
2.1.6	Primer	33
2.1.7	E.Coli Stamm	33
2.1.8	Zelllinien	33
2.1.9	Medien, Lösungen, Puffer.....	34
2.2	Methoden	37
2.2.1	Zellkultur	37

2.2.2	Handhabung humaner Blutproben.....	37
2.2.3	PBMC-Isolation	40
2.2.4	Manuelle mikroskopische Zellzählung	41
2.2.5	Monozyten-Reduktion.....	41
2.2.6	Nachweismethoden für Zellproliferation	42
2.2.7	Re-Stimulationsversuche.....	46
2.2.8	Immobilisierung	46
2.2.9	PCR	47
2.2.10	Agarose-Gelelektrophorese	48
2.2.11	Restriktionsverdau.....	49
2.2.12	Klonierung.....	50
2.2.13	CHO Transfektanten	53
2.2.14	Messung von Zelloberflächenantigenen im Durchflusszytometer.....	54
2.2.15	Mikrovesikel.....	57
2.2.16	Western Blot.....	58
2.2.17	Intrazelluläre Kalziummessung.....	60
2.2.18	Messung der Zytokine	61
2.2.19	Schnelltest ELISA	61
2.2.20	Statistische Auswertung	62
3	Ergebnisse	63
3.1	Welche Subpopulation der PBMC reagiert auf eine CD3 mAk Stimulation?	63
3.1.1	Was sind die optimalen Parameter für eine CD3 mAk induzierte T Zell Stimulation?	69
3.2	Kommt es durch einen CD3 Stimulus von PBMC zu einem Ausstoß von Zytokinen?	71
3.3	Welche Signalkaskade wird durch anti-CD3 mAk ausgelöst?.....	73
3.4	Ist der Responder/Non-Responder Status in Krebspatienten verändert?.....	81
3.5	Ist es genetisch determiniert Responder oder Non-Responder zu sein?.....	84
3.5.1	Welchen Einfluss haben Monozyten bei der CD3 mAk induzierten T Zell Proliferation?.....	84
3.5.2	Welche Fcγ-Rezeptoren sind für die mitogene Wirkung der CD3 mAk notwendig?	88
3.6	Wie kann der Responder/Non-Responder Status am effizientesten nachgewiesen werden?.....	93

3.7	Welchen Einfluss übt ein Ko-Stimulus auf die CD3 mAk induzierte T Lymphozyten Proliferation aus?	96
3.7.1	Wann ist eine Ko-Stimulation CD3 mAk stimulierter Zellen notwendig?	99
3.7.2	Welche Wirkung haben Mikrovesikel auf die CD3 induzierte T Zell Proliferation?.....	102
3.8	Warum sind CD3/OKT3 mAk stimulierte Zellen nicht re-stimulierbar?.....	106
3.9	Welchen Einfluss hat der Responder/Non-Responder Status bei Melanompatienten ?	108
4	Diskussion.....	112
4.1	CD3 Antikörper eignen sich nicht zur Simulation einer physiologischen T Zell Stimulation.....	112
4.1.1	Die CD3 mAk induzierte T Lymphozyten Proliferation verändert das CD4/CD8 Verhältnis von PBMC zugunsten der CD8 ⁺ Zellen	112
4.1.2	Eine CD3 mAk Stimulation von PBMC führt zur Ausschüttung verschiedener Zytokine	114
4.1.3	Eine αCD3 induzierte T Zell Proliferation wirkt nicht über die klassische TZR Signalkaskade	119
4.1.4	Eine CD28 Ko-Stimulation zeigt ihre Wirkung bei einer nicht maximalen CD3 mAk Stimulation.....	123
4.2	Der Responder/Non-Responder Status wird durch einen Polymorphismus im CD32a Gen genetisch determiniert	128
4.2.1	Der Anteil weiblicher Responder ist in gesunden Probanden vermindert	128
4.2.2	Monozyten dienen als Gerüst zum TZR <i>Clustering</i>	128
4.2.3	Der CD3/UCHT-1 Responder/Non-Responder Status ist durch einen CD32a Polymorphismus bedingt	132
4.3	Der CD3/UCHT-1 Responder/Non-Responder Status korreliert mit malignen Erkrankungen wie Hautkrebs und Leukämie	134
4.3.1	Der Anteil weiblicher CD3/UCHT-1 Responder ist in Krebspatienten erhöht	134
4.3.2	Die Kenntnis des CD3/UCHT-1 Responder und Non-Responder Status ist sowohl klinisch als auch experimentell von Bedeutung	138
4.3.3	Ein ELISA kann als phänotypischer Responder/Non-Responder Schnelltest genutzt werden	140
5	Zusammenfassung.....	142
6	Literaturverzeichnis	144
7	Anhang	161
7.1	Abkürzungen	161

7.2	Abbildungsverzeichnis	164
7.3	Tabellenverzeichnis	165
7.4	Publikationsverzeichnis/Auszeichnungen	166
7.5	Danksagung	167
7.6	Lebenslauf	168
7.7	Erklärungen	169

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Ein intaktes Immunsystem ist für die körperliche Unversehrtheit aller Lebewesen von großer Bedeutung. Es zieht sich wie ein Netz durch den gesamten Körper und besteht aus Organen wie der Haut, dem Darm, den Lymphknoten sowie Lymphgewebe, aus dem Knochenmark, aus zellulären und gelösten Stoffen. Das Immunsystem kämpft als Abwehr des Körpers gegen eindringende Krankheitserreger und Fremdstoffe, muss aber gleichzeitig die gefährlichen (Mikroorganismen, Viren, Pilze, Parasiten, Toxine) von den ungefährlichen (kommensale Bakterien, Fötus, Nahrungsbestandteile) Fremdstoffen unterscheiden (Matzinger 1998). Eine Schwäche der Fremdstofferkennung des Immunsystems zeigt sich in Form von Allergien. Dabei reagiert das Immunsystem übermäßig gegen Stoffe, die nicht bedrohlich für den Organismus sind, wie beispielsweise Pollen. Diese allergischen Reaktionen können bis hin zum anaphylaktischen Schock und Tod führen (Lippolis 2008). Das Immunsystem erkennt aber nicht nur körperfremde Stoffe, sondern auch körpereigene Zellen, die entartet sind und beseitigt werden müssen. Wenn das Immunsystem sich allerdings gegen gesunde, körpereigene Zellen richtet, kann diese Überreaktion zu schwerwiegenden Krankheiten, den Autoimmunkrankheiten (z.B. Multiples Sklerose, Morbus Crohn, Diabetes mellitus Typ I) führen. Sowohl ein übermäßig aktives als auch ein supprimiertes Immunsystem kann somit schwerwiegende Folgen für den Organismus haben. Ein schwaches Immunsystem kann sowohl genetisch bedingt sein als auch durch Krankheiten hervorgerufen werden, welche die Zellen des Immunsystems beeinträchtigen (etwa AIDS oder Leukämien) (Becquart et al. 2010, Cantoni, Recher 2014). Um ein ausbalanciertes Immunsystem zu unterstützen, ist das Wissen um die molekularen Mechanismen desselben von großer Bedeutung. Sowohl die Diagnose als auch die Therapie von Erkrankungen kann mit diesem Wissen optimiert werden.

1.1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Das Immunsystem kann in angeborenes und adaptives Immunsystem eingeteilt werden. Schon wirbellose Lebewesen verfügen über einige unspezifische Abwehrmechanismen, auch angeborenes Immunsystem genannt (Muller et al. 2008) Das angeborene Immunsystem bildet die erste Linie der Immunabwehr. Es wirkt schnell und effizient bei einer Vielzahl von

Pathogenen. Um ein Eindringen von Pathogenen in den Körper zu verhindern, besitzt das angeborene Immunsystem mechanische und physiologische Barrieren. Dazu zählen z.B. die Haut, die Schleimhäute oder die Magensäure. Sind dennoch Erreger in das Gewebe eingedrungen, breiten sie sich zügig im Organismus aus. Daher muss das angeborene Immunsystem schnell reagieren. Zu diesen frühen Abwehrreaktionen zählen unspezifische Komponenten wie das Komplementsystem, antimikrobielle Enzyme, Interleukine und Zytokine. Dazu kommen des Weiteren Mastzellen, NK-Zellen und Phagozyten (Martinelli, Reichhart 2005). Die zu den Phagozyten zählenden Granulozyten wandern bei Entzündungsreaktionen ins Gewebe ein und phagozytieren Erreger oder bekämpfen sie durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies oder anderen toxischen Substanzen (Scapini et al. 2000). Zu den Phagozyten zählen weiter Monozyten sowie dendritische Zellen (DC). Monozyten differenzieren nach ihrer Auswanderung ins Gewebe zu Makrophagen und können Partikel bis hin zu ganzen Mikroorganismen beseitigen. Über Mustererkennungsrezeptoren detektieren sie körperfremde Oberflächenproteine und nehmen diese auf. Schließlich wird phagozytiertes Material im Phagosom verdaut. Durch Verdau entstandene Epitope können den T Zellen auf den MHC- Molekülen (major histocompatibility complex) als Antigen präsentiert werden, auch bekannt als MHC-Restriktion (Aderem, Underhill 1999). Daher sind Makrophagen, wie auch DC sogenannte Antigen-Präsentierende Zellen (APC) und stellen eine Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität dar (Steinman, Hemmi 2006). NK-Zellen werden der angeborenen Immunantwort zugeordnet, da sie keine antigenspezifischen Rezeptoren aufweisen. Sie detektieren und eliminieren virusinfizierte Zellen, die den T Zellen durch die reduzierte Expression von MHC-Molekülen entgangen sind (Bukowski et al. 1985). Das angeborene Immunsystem reagiert in einer Primärantwort schnell und wirkt auf eine Vielzahl von Pathogenen. Daher ist es allerdings unspezifisch was wie beispielsweise die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies durch Granulozyten auch zu Kollateralschäden des Wirts führen kann (Mydel et al. 2006).

Die im Laufe der Evolution entstandene erworbene oder adaptive Immunreaktion ist dagegen eher langsam, dafür aber spezifisch gegen ein bestimmtes Pathogen gerichtet. Es ist eine Weiterentwicklung des angeborenen Immunsystems und kann antigenspezifische Abwehrreaktionen in Form eines zellulären Gedächtnisses speichern um bei erneuter Infektion mit einem bereits bekämpften Pathogen recht schnell und sehr effektiv zu reagieren (Ezekowitz, Hoffmann 1996). Die erworbene Immunität wird durch T- sowie B Lymphozyten vermittelt.

1.2 T Lymphozyten

T Lymphozyten reifen im Thymus, woher auch ihr Namen stammt (Graf 2008). Bei der Reifung finden funktionelle Selektionen statt. Diese sorgen für einen funktionstüchtigen T Zell Rezeptor (TZR), der körperfremde, aber keine körpereigenen Antigene erkennen kann (Murphy, Travers 2009). Da sich der Thymus im Erwachsenenalter zurückbildet und nur ein Restkörper verbleibt, wird das T Zell Repertoire bei Erwachsenen u.a. aus langlebigen T

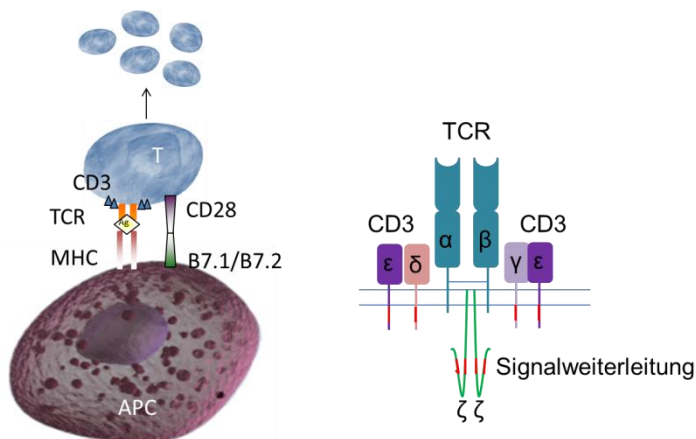


Abbildung 1 T Lymphozyten Aktivierung. Bei der Interaktion von Antigen präsentierender Zelle (APC) und T Zelle erkennt der T Zell Rezeptor (TZR) das vom Major Histocompatibility complex (MHC) präsentierte Antigen und leitet ein Signal ins Innere der TZelle. Dieses Signal führt allein zur Anergie der T Zelle. Für eine Aktivierung des T Lymphozyten wird ein weiteres ko-stimulatorisches Signal benötigt, beispielsweise durch die Interaktion von CD28 auf T Zellen und dem B7 Komplex auf APC. Beide Signale in Kombination führen zur Sekretion von Zytokinen seitens der T Zelle. Die Signalweiterleitung durch Antigenbindung erfolgt durch CD3 Komplexe neben dem TZR.

Zellen sowie aus reifen, sich teilenden T Zellen der zentralen lymphoiden Gewebe aufrechterhalten (Wilde 2007). Gereifte T Lymphozyten wandern in die Peripherie und treffen in sekundären lymphoiden Organen auf APC, die ein pathogenes Peptid (Antigen) präsentieren.

T Lymphozyten können allerdings keine freien Antigene erkennen, sondern nur solche, die an MHC Moleküle gebunden präsentiert werden. MHC Moleküle sind Oberflächen-Antigene und helfen bei

der Erkennung körpereigener Zellen. Beim Menschen werden die MHC Moleküle unter dem HLA System (Human Leukocyte Antigen) zusammengefasst (Ljunggren, Karre 1990). Die Bestimmung des HLA Typs ist z.B. wichtig für die Histokompatibilität bei einer allogenen Transplantation. Antigene auf MHC I Molekülen können von fast allen Zellen präsentiert werden, MHCII Moleküle hingegen werden nur auf APC exprimiert. Dazu zählen in erster Linie DC und Makrophagen, aber auch B Zellen. Die Erkennung des MHC Moleküls mit geladenem Pathogenpeptid erfolgt über den TZR, einem Heterodimer bestehend aus einer α - und einer β Kette ($\alpha\beta^+$ T Zellen) oder seltener aus einer γ - und einer δ Kette ($\gamma\delta^+$ T Zellen). Für die Signalweiterleitung ins Zellinnere sind mit dem TZR assoziierte CD3 Moleküle verantwortlich (Reth 1989). Diese bestehen aus einer γ -, einer δ - und zwei ϵ Einheiten und sind nicht kovalent mit dem TZR verbunden. Zusammen mit einem Homodimer aus ζ Ketten bilden CD3 Moleküle und TZR den funktionellen T Zell Rezeptor Komplex (Terhorst et al.

1996). Erkennt eine T Zelle ein MHC präsentierte Antigen, wird ein Signal durch die mit dem TZR assoziierten CD3 Komplexe weitergeleitet. Dieses Signal reicht allerdings üblicherweise nicht aus, um eine T Zelle zu aktivieren, das Gegenteil ist der Fall. Bekommt ein T Lymphozyt lediglich das Signal über den TZR-CD3 Komplex, so führt dies zur Anergie oder Apoptose der T Zelle (Yashiro et al. 1998, Chai et al. 1999). Ein Zustand, in dem die Zelle nicht weiter auf Antigene reagieren kann und sozusagen abgeschaltet wird. Ein anergischer Zustand ist permanent und dient dem Körper als Schutz vor dem T Zell Angriff körpereigener Zellen (Selmi 2013). Damit es zu einer vollständigen Aktivierung der T Zelle kommt, wird neben dem MHC-Peptid Signal über den TZR-CD3 Komplex noch ein ko-stimulatorisches Signal benötigt. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Interaktion von CD28 auf der T Zelle mit dem B7 Komplex (B 7.1, B 7.2) der APC. Es gibt aber auch andere Ko-Stimulatoren wie beispielsweise die Interaktion von Icos (Inducible T cell Co-stimulator, auch CD287) und dem Icos-Ligand (Hutloff et al. 1999). Durch die Kombination der Signale über TZR und Ko-Stimulus kommt es zur Aktivierung der T Zelle und zur Ausschüttung von Interleukin 2 (IL-2) wodurch die klonale Proliferation der T Zelle gefördert wird (Murphy, Travers 2009). Dabei differenzieren naive T Zellen zu unreifen Gedächtniszellen (T_{CM}). Diese Zellen wandern in das Keimzentrum der Lymphknoten, wo sie sich zu Effektorzellen (T_{EM}) weiterentwickeln, welche den Lymphknoten verlassen und in die Peripherie auswandern (Pezzutto, a Ulrichs 2007). Welche Funktion eine Effektorzelle übernimmt, hängt davon ab, welche Botenstoffe sie sezerniert (Mosmann et al. 2005). Dabei unterscheidet man verschiedene T Zell Subpopulationen. Die Unterscheidung von Leukozyten erfolgt anhand von CD (Cluster of differentiation) Molekülen auf der Oberfläche der Zellen. Die CD Moleküle können verschiedene Funktionen haben und z.B. Rezeptoren, Liganden oder Adhäsionsmoleküle sein. Durch den Nachweis der Präsenz mehrerer CD Moleküle lassen sich Immunzellen und auch andere Zellen phänotypisieren. T Zellen tragen beispielsweise alle den Marker CD3, wobei Subpopulationen durch weitere Marker wie CD4, CD8 oder CD25 unterschieden werden können. Zytotoxische T Zellen sind CD8 positiv, wohingegen T Helferzellen CD4 auf der Oberfläche exprimieren. CD4 und CD8 werden zudem als Ko-Rezeptoren bezeichnet, da sie bei der Antigenerkennung an das MHC Molekül binden. Dabei interagiert CD4 mit MHC Klasse II Molekülen und CD8 mit MHC Klasse I Molekülen. CD8 positive T Zellen, die auch T Killerzellen genannt werden, sind besonders geeignet, virusinfizierte Zellen abzutöten (Parnes 1989). CD4 positive Zellen sind spezialisiert auf Pathogen- und Parasitenabwehr und können sich zu T Helferzellen des Typ 1, 2 oder 17 entwickeln. Dabei kann jeder Typ ein unterschiedliches Arsenal von Zytokinen freisetzen und

somit verschiedene Immunantworten auslösen, die spezifisch gegen bestimmte Pathogene gerichtet sind. Regulatorische T Zellen (T_{reg}) gehören ebenfalls zu den CD4 positiven T Zellen und sind zudem positiv für CD25. Sie fungieren als Suppressoren des Immunsystems und regulieren so die Selbsttoleranz und die Herunterregulierung des Immunsystems.

1.2.1 Signalvermittlung in T Lymphozyten

Um durch das Aufeinandertreffen von T Zelle und APC eine T Zell Aktivierung zu erreichen, ist eine Signalübertragung ins Zellinnere notwendig. Den dabei entstehenden, engen Kontakt zwischen T Zelle und APC bezeichnet man als immunologische Synapse (IS). Eine IS kann für Minuten bis Stunden bestehen und ist erstmals 1998 beschrieben worden (Monks et al. 1998). IS, auch supramolekulare Adhäsionskomplexe (SMAC) genannt, sind aus konzentrischen Ringen aufgebaut. Sie besteht aus einer zentralen Anhäufung von TZR, CD4, CD8 und CD28, umgeben von einem Ring aus Adhäsionsmolekülen aus der Familie der Integrine. Die Struktur ist wichtig, um alle an der Signalvermittlung beteiligten Rezeptoren in räumliche Nähe zu bringen. Ist der TZR durch den MHC Kontakt in diese glykolipidreiche Mikrodomäne des SMAC gelangt, kommt es im zytoplasmatischen Teil zur Annäherung von Tyrosinkinasen und Elementen des Zytoskeletts (Montixi et al. 1998). Durch Umlagerung des Zytoskeletts werden weitere Signalmoleküle zur Kontaktstelle befördert. Die Bindung des CD4/CD8 Ko-Rezeptors an das jeweilige MHC Molekül transportiert die Tyrosinkinasen Lck und Fyn in räumliche Nähe zum TZR (Turner et al. 1990). Werden diese Moleküle durch die Ligation des CD28 Moleküls aktiviert, phosphorylieren sie wiederum Tyrosinreste der ζ - und CD3 Ketten, an die wiederum das Signalmolekül Zap-70 binden kann (August, Dupont 1994). Zap-70 seinerseits phosphoryliert die membranständigen Adaptorproteine SLP76 und LAT (linker of activation in T cells) (Watts et al. 1996). Diese Adaptorproteine setzen zum einen die MAP-Kinase Kaskade in Gang, an deren Ende die Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Nukleus steht und aktivieren zum anderen die Phospholipase C (PLC). Durch die Aktivierung der PLC kommt es über die Aktivierung der Proteinkinase C zur Modulation von NF κ B sowie zur Ausschüttung von Kalzium aus intrazellulären Speichern. Die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration sorgt für die Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren. An diesem Schritt ist zudem die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) beteiligt. Diese wird durch den ko-stimulatorischen CD28 Rezeptor in die Nähe des T Zell Rezeptors gebracht und durch die Bindung eines geeigneten Ko-Stimulus aktiviert (Panayotou, Waterfield 1992, Schneider et al. 1995). Lat und SLP-76 fördern außerdem die

Aktivierung vieler anderer Signalproteine wie den mitogenaktivierten Proteinkinasen (Akt, p38, JNK und Erk) (Huang, Wange 2004). Am Ende der komplexen Signalkaskade (vgl. Abb. 33) steht die Expression von Genen, wie beispielsweise IL-2.

1.2.2 T Lymphozyten Aktivierung *in vitro*

Um die Proliferation von T Zellen *in vitro* nachzuahmen, gibt es verschiedene Möglichkeiten und Substanzen, die zum Einsatz kommen. Es können pharmakologische Substanzen wie Phorbol ester (z.B. PMA, PHA), allein oder in Kombination mit Kalzium Ionophoren (z.B. A23187) genutzt werden. Eine Stimulation mit bakteriellen oder viralen Substanzen ist ebenfalls gebräuchlich (LPS, Superantigene).

Eine klassische und oft genutzte Methode ist die Verwendung von monoklonalen antiCD3 Antikörpern (CD3 mAk). Dabei kann der CD3 mAk löslich zu den Zellen gegeben werden (Van Wauwe et al. 1984) oder am Boden des Inkubationsgefäßes immobilisiert werden. Die Immobilisierung soll für eine Quervernetzung der TZRs sorgen und somit dem natürlichen Stimulus ähnlicher sein (Yang et al. 1996). Meist wird zusätzlich ein ko-stimulatorischer mAk, üblicherweise α CD28 eingesetzt (Levine et al. 1996). Um APC des physiologischen Systems noch besser nachzuahmen, werden auch Beads genutzt, die sowohl CD3- als auch CD28 mAk tragen (Bardel et al. 2008).

1.3 Periphere mononukleäre Blutzellen

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) sind Immunzellen mit nur einem runden Zellkern. Zu diesen Zellen gehören B- und T Lymphozyten, NK Zellen, Monozyten und DC (Boyum 1968). In gesunden Individuen setzen sich PBMC prozentual aus folgenden Subpopulationen zusammen: 60-70% T Lymphozyten, darunter bis zu 50% CD4⁺- und bis zu 30% CD8⁺ T Lymphozyten; 5-15% B Lymphozyten; 15-30% Monozyten; 5-10% NK Zellen und 1-2% DC (Freudenthal, Steinman 1990). Die DC des peripheren Blutes sind Vorläuferzellen, die durch ihre Oberflächenmoleküle von den morphologisch kaum zu unterscheidenden Monozyten abgegrenzt werden können und noch keine MHCII Moleküle exprimieren (Thomas, Lipsky 1996). Dabei können die DC Vorläufer sowohl der myeloiden als auch der lymphoiden Linie entstammen. (O'Doherty et al. 1993).

Das Verhältnis von CD4⁺- zu CD8 positiven T Lymphozyten in PBMC liegt zwischen 1,5 und 2,5 (Amadori et al. 1995). Eine Umkehrung des CD4/CD8 Verhältnisses hin zu Werten unter 1 steht mit Viruserkrankungen wie HIV, Eppstein-Barr und dem Zytomegalovirus in Verbindung und ist überdies ein Kennzeichen für Transplantationsabstoßungen oder eine Häophilie (Gratama et al. 1986, Menitove et al. 1983). Ein niedriges CD4/CD8 Verhältnis, welches nicht pathologisch ist, findet man hingegen nach einer starken körperlichen Belastung. Der Wert normalisiert sich dabei allerdings innerhalb von 24 h nach Ende der Belastung (Shek et al. 1995). Auch in älteren Menschen (>80 Jahre) zeigt sich häufig ein umgedrehtes CD4/CD8 Verhältnis. Dort wird es als „Immun Risiko Profil“ bezeichnet, da diese Menschen eine verringerte zwei Jahres Überlebensrate aufweisen (Ferguson et al. 1995).

1.4 Monozyten

Monozyten sind mit einem Durchmesser von 12-20 µm relativ große Leukozyten mit einem nierenförmigen Kern. Sie zirkulieren im Blut und können sich zu Makrophagen oder DC differenzieren, wenn sie den Blutkreislauf verlassen. Im Gegensatz zu Monozyten mit einer Halbwertszeit von bis zu drei Tagen (Whitelaw 1972) sind Makrophagen langlebige Zellen, die Monate bis Jahre überleben können (Siegenthaler, Amann-Vesti 2006). Makrophagen und Monozyten sind phagozytierende Zellen. Ihre Funktion besteht darin, Pathogene, tote Zellen und Zelltrümmer zu beseitigen. Diese Funktion übernehmen sie bei einer Immunantwort auch mit infizierten Zellen. Zudem sind sie in der Lage pro-inflammatorische Botenstoffe zu synthetisieren und auszuschütten (z.B. IL-1 β , IL-2, IL-6 und TNF- α), die andere Immunzellen aktivieren und bzw. anlocken (Luster 2002). So führt beispielsweise die Ausschüttung von IL-1 zur Aktivierung von T Helferzellen (Coccia et al. 2012).

1.5 Zytokine

Eine wichtige Komponente der Kommunikation des Immunsystems sind die Zytokine. Darunter versteht man kleine, lösliche Moleküle, die von nahezu allen Zelltypen, vor allem von Immunzellen, abgegeben werden. Zytokine können lokal auf die Zelle, die sie produziert und auf Nachbarzellen wirken, aber auch eine Auswirkung auf weiter entfernt liegende Zellen ist möglich. Dabei zeigt sich ihre Wirksamkeit bereits im nanomolaren Bereich (Lippolis 2008). Die ausgeschütteten Zytokine werden von Rezeptoren der Zielzelle wahrgenommen, sodass ein Signal in das Innere der Zelle weitergeleitet wird (Zola 1996). Die Antwort der Zielzelle auf ein bestimmtes oder ein Set von Zytokinen ist vielfältig. Dazu zählen eine veränderte Genexpression, Differenzierung, Apoptose, Proliferation oder Zellmigration. Zytokine lassen sich in fünf Hauptgruppen einteilen: Interleukine (IL), Interferone (IF), Tumornekrosefaktoren (TNF), koloniestimulierende Faktoren und Chemokine (Evans 1993). Der Nomenklatur folgend sind IL Zytokine, die von Leukozyten und Makrophagen produziert werden und der Regulation der Immunantwort dienen. Ausnahmen wie die IL-1 β Produktion von Epithel- und Endothelzellen zeigen, dass diese Nomenklatur nicht uneingeschränkt gilt. Interferone wirken protektiv bei viralen Erkrankungen und malignen Tumoren. Koloniestimulierende Faktoren zählen zu den Wachstumsfaktoren und stimulieren die Proliferation und Differenzierung von Knochenmarksstammzellen. Chemokine dienen als Lockstoffe, die Immunzellen zu Infektionsherden leiten und bei deren Austritt aus Lymphgefäßen mitwirken (Baggiolini 2001). Welche Zytokine auf eine naive Immunzellen wirken bestimmt maßgeblich zu welchem Zelltyp diese Zelle differenziert (Murphy, Travers 2009).

Tabelle 1: Auflistung der für diese Arbeit wichtigen Zytokine. Informationen und zugehörige Quellen aus der Datenbank cope-with-cytokines (www.copewithcytokines.de) entnommen.

Zytokin	Produzenten	Rezeptor	Wirkung
IL-1β	Monozyten/ Makrophagen, Epithelzellen	CD121a/b	T Zell Aktivierung, Makrophagen Aktivierung
IL-2	T Zellen	CD2R $\alpha\beta\gamma$ (auch IL15)	T Zell Proliferation
IL-4	Aktivierte T Zellen (hauptsächlich T _H 2, wenig T _H 1), Mastzellen	IL-4R, der auch IL-13 bindet	B Zell Proliferation; Expression von MHC II; Wechsel von IgM zu IgE Produktion; Proliferation von Thymozyten und hämatopoetischen Vorläuferzellen; Inhibition: Zytokinsynthese in Makrophagen, IL-2 induzierte Aktivierung von NK Zellen; natürliche Antagonisten: IL-22 und IL4-delta-2.
IL-5	T Zellen (T _H 2)	IL5R $\alpha\beta\gamma$ der auch IL3 bindet	Wachstum und Differenzierung von Eosinophilen; verstärkte Differenzierung zu CTL; Regulation des IL-2 Rezeptors in Thymozyten
IL-6	Monozyten, Endothel-, T-, B Zellen	IL-6 R	Hauptvermittler der akuten Phase Reaktion; B Zell Differenzierung; T Zell Differenzierung zu CTL; Bildung von AK in Plasmazellen.
IL-9	Aktivierte T _H Zellen	IL-9R	Proliferation von T _H Zellen in Abwesenheit von APC; Potenzierung IL-4 induzierter IgG, IgM und IgE Produktion in B Zellen
IL-10	Aktivierte CD8 T Zellen, Mastzellen und Monozyten	IL10R α , IL10R $\beta\gamma$	Sekretionsinhibition pro-inflammatorischer Zytokine von Monozyten; Herunterregulation von Th1 Zytokinen, MHC II Antigenen, kostimulatorische Moleküle auf Makrophagen; B-Zellüberleben, Proliferation und Antikörperproduktion; Hemmung NF κ B Aktivität; Regulation vom JAK- STAT Signalweg; Zytokinsynthese-Hemmung; Inhibition Makrophagen: Produktion von IL-1,6, TNF α , Fähigkeit zur Antigenpräsentation (\rightarrow Gegenspieler Interferon-gamma); selektiv wirksame chemotaktische Aktivität auf CD8 cytotoxische Zellen; von TH2 freigesetzt: nahezu vollständige Hemmung von Zytokinsynthese durch TH1
IL-12p70	Aktivierte Phagozyten und DC	IL-12R (CD212)	Induktion durch Bakterien und Parasiten; aktiviert CD56 ⁺ NK Zellen; Inhibitor: IL-10
IL-13	Aktivierte periphere T Zellen	IL-13R (CD132 γ c)	Suppression von TH1 Zellen, IgE Klassenwechsel, B Zell Wachstumsfaktor
IL-17A	Stimulierte T Helferzellen	IL-17RA (CD217)	Expression von ICAM-1 auf Fibroblasten; Stimulation: Epithel-, Endothel- und Fibrobasenzellen zur Ausschüttung von IL-6, IL-8 und G-CSF; fördert Angiogenese
IL-22	T Zellen (nach CD3 Stimulierung), Mastzellen	Rezeptorsyste m IL-10R- beta/CRF2-4 und	akut Phase Reaktionen in Leber und Pankreas; Homologie zu IL-10, ungleiche Funktion; Sekretion durch IL-9 und bakterielle Polysaccharide
IFNγ	T Zellen, NK Zellen	CD119	Makrophagenaktivierung, Ig Klassenswitch zum IgG, Verstärkung der MHC Klasse II Funktion; antivirale und antiparasitäre Wirkung; Wachstumsfaktor für T Zellen, Induktion: IL-2 oder EGF; Hemmung: Vitamin D3, Dexamethason oder CyclosporinA
TNFα	Monozyten/ Makrophagen, Neutrophile, NK Zellen, T Zellen (CD4 ⁺ mehr als CD8 ⁺)	CD120a/b	Phagocytose und Zytotoxizität von Granulozyten Expressionsmodulation verschiedener Gene: myc, IL-1, IL-6; Lockstoff für Neutrophile; zytolytische und zytostatische Wirkung auf Tumorzellen <i>in vitro</i> ; Wachstumsfaktor für Fibroblasten,; Proliferation nicht IL-2 stimulierter T Zellen (mit IL-2 kommt es zur B Zell Proliferation und Differenzierung); Induktion: LPS, Interferone, IL-2 und GM-CSF; Inhibition: IL-6, TGF β , Vitamin D3, Dexamethason und CyclosporinA

1.6 B Lymphozyten und Immunglobuline

Die Hauptaufgabe der B Lymphozyten besteht in der Produktion von Immunglobulinen. Diese Immunglobuline, auch Antikörper genannt, sind Proteine, die im Blut zirkulieren und einen wichtigen Bestandteil des adaptiven Immunsystems von Vertebraten darstellen. Sie erkennen spezifisch Antigene, meist Peptide oder Polysaccharide auf fremdartigen Zellen oder Pathogenen und helfen durch Opsonierung dabei diese zu eliminieren. Astrid Fagraeus beschrieb 1947 erstmals, dass Antikörper von Plasmazellen produziert werden (FAGRAEUS 1947). Bevor sie sezerniert werden, sind sie als Transmembranproteine auf der Oberfläche von B Zellen verankert und werden als B Zellrezeptor (BZR) bezeichnet. Im Zuge einer Immunreaktion differenzieren die B Zellen zu Plasmazellen, welche darauf spezialisiert sind große Mengen löslicher Antikörper ohne Transmembrandomäne zu sezernieren. Der Y-förmige Aufbau eines Antikörpers ist wichtig für seine Funktion. Er besteht aus zwei schweren Ketten, die am Stamm der Y-Form durch Disulfidbrücken und andere nicht-kovalente Wechselwirkungen verbunden sind. An den Armen des Y binden Disulfidbrücken zu beiden Seiten leichte Ketten an die schweren Ketten. Somit entsteht ein achsensymmetrisches Heterotetramer (siehe Abb. 2).

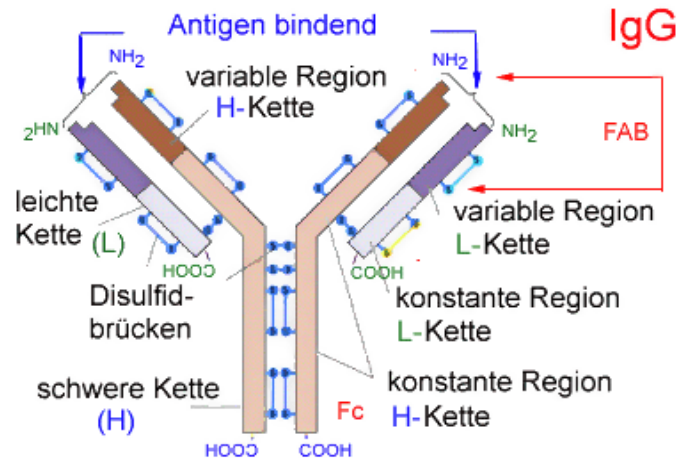


Abbildung 2 Aufbau eines Immunglobulins. Die schematische Darstellung zeigt den Aufbau eines Antikörpers als achsensymmetrisches Heterotetramer bestehend aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Entnommen aus www.biokurs.de

Der Fuß des Y, bestehend aus Teilen der schweren Kette, wird als Fc- oder auch Ig-Fragment bezeichnet. Er ist wichtig für die Effektorfunktion des Antikörpers und kann an Fc Rezeptoren und Komponenten der Komplementkaskade binden (Bohana-Kashtan et al. 2004). An den Enden der Y Arme, den sogenannten FAB Fragmenten (fragment of antigen binding), befinden sich die Antigen-Bindungsstellen. Jeder Antikörper wirkt spezifisch gegen

ein bestimmtes Antigen und besitzt dafür zwei Bindungsstellen. Durch eine Vielzahl verschiedener Genzusammenlagerungen in der variablen Region des Antikörpers kommt es zu einem vielfältigen Genrepertoire, das im Menschen etwa 10^6 verschiedene Antikörperspezifitäten beschreibt (Schütt, Bröker 2009). Die konstante Region des Antikörpers bestimmt dagegen den Isotyp. In Abb. 2 ist beispielhaft ein Ig des Typs G gezeigt. Die Abschnitte der leichten Ketten in der konstanten Region können dem κ oder dem λ Typ entsprechen. Die fünf Typen der schweren Ketten definieren unterschiedliche Ig Subtypen. Der μ Typ entspricht IgM, welches nach der Reifung im Knochenmark von naiven B Zellen als BZR exprimiert wird. Als Antikörper sezerniert bildet IgM Pentamere oder Hexamere und ist besonders effektiv bei der Komplementaktivierung. Es wird als erstes Ig bei einer Infektion produziert und ist besonders effektiv gegen Viren und Parasiten. IgD (Typ δ) kommt ebenfalls als BCR auf naiven B Zellen vor, seine Funktion ist bis dato noch nicht gänzlich aufgeklärt. Der γ Typ IgG ist der häufigste Ig Vertreter im Blutserum. Es wird erst ab etwa der dritten Woche nach einer Infektion gebildet. IgG sind mit einer Halbwertszeit von drei Wochen allerdings vergleichsweise langlebig und daher ein wichtiger Bestandteil des immunologischen Gedächtnisses. IgG Antikörper können des Weiteren in die Subklassen IgG1 bis IgG4 unterteilt werden. IgG1 Antikörper werden bei einer Vielzahl von Erregern produziert, IgG2 besonders bei verkapselnden Bakterien, IgG3 wirkt vornehmlich bei Virusinfektionen und IgG4 wird vor allem nach erfolgreicher Hyposensibilisierung produziert (Cicciarelli et al. 2013). Die wichtigste Aufgabe der IgG Antikörper ist die Neutralisation von eindringenden Pathogenen, daher kommt diese Klasse als einziges Ig Molekül auf der Oberfläche der auskleidenden Schleimhäute sowie in Tränenflüssigkeit und Speichel vor. IgE Antikörper aktivierten Granulozyten. Sie sind wichtig für die Abwehr von Parasiten und verantwortlich für anaphylaktische Reaktionen.

Antikörper werden sowohl in der Biologie als auch in der Medizin verwendet. In der Biologie werden sie für verschiedenste Nachweisverfahren wie ELISA oder die Durchflusszytometrie genutzt. In der Medizin gibt es bereits viele therapeutische Antikörper, wie beispielsweise den anti-TNF α Antikörper Adalimumab, der bei der Bekämpfung von rheumatoider Arthritis eingesetzt wird (Lapadula et al. 2014). Der Einsatz von therapeutischen Antikörpern findet meist im Bereich der Onkologie und Hämatologie statt. Die Diagnostik nutzt beispielsweise radioaktiv-markierte Antikörper bei der Szintigraphie. Für die Anwendung von Antikörpern in der Biologie und Medizin werden oft monoklonale Antikörper genutzt. Diese werden hergestellt, indem Peptide gegen die das Antigen gerichtet sein soll in einen Wirtsorganismus einer anderen Spezies gegeben werden, die sogenannte Immunisierung. Aus der Milz des

Tieres werden dann die dort angereicherten B Zellen isoliert und mit Myelomzellen hybridisiert. Dadurch entstehen hybride Zellen, welche den gewünschten Antikörper produzieren und unsterblich sind (Kohler, Milstein 1976).

Während die B Zellen wie die anderen Leukozyten zur zellulären Immunabwehr zählen, gehören die Antikörper zur humoralen Immunabwehr. Bei einer humoralen (von lat.: humor, Flüssigkeit) Immunantwort handelt es sich um die Bekämpfung von Pathogenen mit Hilfe von nicht-zellulären Bestandteilen. Darunter fallen neben den Antikörpern noch äußere Barrieren wie die Defensine der Haut oder Lysozyme in Speichel und Tränenflüssigkeit (Gallo et al. 2002). Weiterhin zählt dazu das Komplementsystem, welches mit mehr als 30 löslichen Proteinen an der Immunabwehr beteiligt ist (Bohana-Kashtan et al. 2004).

1.7 Fc-Rezeptoren

Fc-Rezeptoren (FcR) sind Glykoproteine, die auf der Oberfläche von vorwiegend hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Sie erkennen den konstanten Teil (Fc- oder Ig-Teil) der schweren Kette von Immunglobulinen. Somit dienen sie als Verbindungsglied zwischen humoraler und zellulärer Immunität. FcR sind an einer Reihe wichtiger zellulärer Funktionen beteiligt, dazu gehört die Aktivierung des Komplement-System, Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), rezeptorvermittelte Phagozytose und Mediatorenfreisetzung (Schäfer 2002). Damit stellen sie eine wichtige Verbindung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem dar. Die Nomenklatur der FcR ist durch ihre Spezifität für bestimmte Immunglobuline definiert. Es gibt spezifische Rezeptoren für jede Antikörperklasse: FcεR für IgE, FcαR für IgA und FcγR für IgG. Für die in dieser Arbeit relevanten IgG Moleküle wurden weiterhin sechs spezifische Rezeptoren für die Subklassen IgG₁₋₄ beschrieben: FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIC (CD32C), FcγRIIIA (CD16A) und FcγRIIIB (CD16B). Dabei bezeichnen die Großbuchstaben strukturell verwandte, aber unterschiedliche Gene (Ravetch, Kinet 1991).

FcγRI wird auf Monozyten, Makrophagen und DC exprimiert und kann humanes IgG1, IgG3 und IgG4 binden (Bruhns 2012). Eine Expression auf Granulozyten kann durch IFNγ induziert werden (Perussia et al. 1983). FcγRI ist der einzige hoch affine IgG Rezeptor im humanen System, der monomeres IgG binden kann. Wie auch bei den anderen FcγR ist eine Bindung an IgG in Immunkomplexen oder gebunden an Zelloberflächen möglich.

FcγRII bindet mit einer geringen Affinität alle humanen IgGs (IgG1-IgG4), ist sehr weit verbreitet und wird auf fast allen hämatopoetischen Zellen exprimiert (Daeron 1997). FcγRIIa

wird auf allen myeloiden Zellen exprimiert, aber nicht auf Lymphozyten oder NK Zellen. Es ist der einzige aktivierende Fc γ -Rezeptor, der konstitutiv auf Mastzellen und Granulozyten exprimiert wird (Bruhns 2012). Fc γ RIIb ist auf zirkulierenden B Lymphozyten stark exprimiert und auf Monozyten nur in geringem Maße (Veri et al. 2007). Fc γ RIIc wird auf NK-Zellen und Granulozyten exprimiert (van der Heijden et al. 2012). Fc γ RIII bindet humane IgGs nur mit einer geringen Affinität und wird auf NK Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert.

Fc γ RII weisen als einzige Fc γ -Rezeptoren ein eigenes Signalweiterleitungsmotiv im zytoplasmatischen Teil auf. Fc γ RIIa und Fc γ RIIc nutzen als aktivierende Rezeptoren ein *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) und Fc γ RIIb als inhibierender Rezeptor ein *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* (ITIM) (van Sorge et al. 2003). Die aktivierenden Rezeptoren Fc γ RI und Fc γ RIIIa benötigen für die Signalweiterleitung eine γ -Untereinheit. Der inhibierende Fc γ RIIIb ist GPI verankert und besitzt daher kein Signalweiterleitungsmotiv (Ra et al. 1989).

1.7.1 CD32a Polymorphismus

Die Vielfalt von Fc-Rezeptoren wird durch eine Reihe von Polymorphismen in der extrazellulären Domäne der Rezeptoren erweitert. So ist eine einzelne Substitutionen für Fc γ RIIa (Arginin - Histidin) und Fc γ RIIIa (Valin - Phenylalanin) bekannt und eine vierfache Substitution für Fc γ RIIIb (Neutrophil Antigen Polymorphismus) (Dijstelbloem et al. 2001). Die Substitution von Arginin (R) zu Histidin (H) an der Aminosäureposition 131 des Fc γ RIIa Rezeptors bedingt zwei Allele von Fc γ RIIa, das R Allel und das H Allel. Auf den Organismus bezogen, bedeutet dies, dass es verschiedene Genotypen gibt: homozygot H/H, homozygot R/R und heterozygot R/H. Die Verteilung der Allelvarianten im europäischen Raum ist H/H 25-30%, H/R: 45-50% und R/R: 25-30% (Lehrnbecher et al. 1999). Dieser Polymorphismus zeigt eine funktionelle Relevanz, da durch die Substitution das Bindungsverhalten des Rezeptors verändert wird (Bruhns 2012). So können beide Varianten murines IgG2a und-2b binden, allerdings ist nur das R Allel in der Lage murines IgG1 zu binden. Für humanes IgG zeigt sich für beide Varianten nur eine sehr leichte Bindung von humanem IgG4, humanes IgG3 dagegen, wird am stärksten gebunden, gefolgt von IgG1. Ebenso gut kann der H Allotyp humanes IgG2 binden, wohingegen die Bindung an den R Allotyp nur sehr schwach ist. Überdies ist Fc γ RIIa der einzige IgG2 bindende Rezeptor (Bruhns 2012, Dijstelbloem et al. 2001, van Sorge et al. 2003, Warmerdam et al. 1990)

Das Bindungsvermögen von humanem IgG2 hat direkten Einfluss auf die Bekämpfung bakterieller Infektionen. So sind homozygote und in geringerem Ausmaß heterozygote CD32a R Allel tragende Individuen anfälliger für Infektionen mit verkapselnden Bakterien, da diese bei der Opsonierung von Antikörpern des IgG2 Typs markiert werden (Sanders et al. 1993). Der Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin hat allerdings auch einen Einfluss auf eine Vielzahl anderer Erkrankungen wie SLE (systemischer Lupus erythematoses), Nephropathie oder neurologischen Störungen wie Myasthenia gravis (Haseley et al. 1997, Dijstelbloem et al. 2000, van der Pol et al. 2000, Raknes et al. 1998).

1.8 Das Immunsystem und Krebs

Wie zuvor erwähnt kämpft das Immunsystem nicht nur gegen körperfremde Zellen, es erkennt und beseitigt auch körpereigene Zellen, die verletzt, alt oder entartet sind. Da Tumorzellen genetisch instabil sind, können sie sich stetig verändern. Wie bei einem Ausleseverfahren überleben und vermehren sich besonders Tumorzellen, die nicht vom Immunsystem erkannt werden („Immun-Escape“) (Dunn et al. 2002). Wie Krebszellen es genau schaffen dem Immunsystem zu entgehen, ist Gegenstand vieler Untersuchungen (Bruttel, Wischhusen 2014).

1.8.1 Leukämie

Nahezu jeder Zelltyp kann entarten, so auch die Immunzellen selbst. Eine Krebserkrankung des blutbildenden Systems, die Leukämie, liegt bei etwa 11.500 Neuerkrankungen pro Jahr (Robert Koch Institut 13.12.2013). Bei einer Leukämie kommt es zu einer stark vermehrten Bildung von Leukozyten und deren Vorstufen. Dadurch kann die normale Blutbildung verdrängt werden, Organe können infiltriert werden und eine Ausschwemmung unreifer Blutzellen in die Peripherie ist möglich. Man unterscheidet eine akute und eine chronische Form der Leukämie. Die akute Form zeichnet sich vor allem durch die Vermehrung proliferationsuntüchtiger Blasten aus, zeigt einen raschen Verlauf mit frühzeitigen Symptomen und tritt gehäuft im Kindesalter auf. Von der chronischen Leukämie sind besonders Erwachsene betroffen und es kann Monate bis Jahre dauern bis es zum Ausbruch der Krankheit kommt. Weiterhin gibt es eine Unterscheidung in myeloische und lymphatische Leukämie. Bei der myeloischen Leukämie kommt es zur Entartung myeloider

Zellen und deren Vorläufer, vor allem von Granulozyten. Bei der lymphatischen Leukämie hingegen entarten Lymphozyten und deren Vorläufer. Insgesamt lassen sich so vier Hauptformen der Leukämie unterscheiden, die akute lymphatische Leukämie (ALL), die chronische lymphatische Leukämie (CLL), die akute myeloische Leukämie (AML) und die chronische myeloische Leukämie (CML).

Tabelle 2 Anteil verschiedener Leukämieformen anhand aller Neuerkrankungen in Deutschland 2009-2010 (http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Leukaemien/leukaemien_inhalt.html)

%	ALL	CLL	AML	CML	Sonstige
Männer	8	40	24	10	18
Frauen	8	34	30	10	18

Tabelle 2 zeigt die Häufigkeit der Verteilung dieser vier Hauptformen aufgeteilt nach Geschlecht. Im Jahr 2010 war die häufigste Form der Leukämieerkrankung die CLL dicht gefolgt von der AML. Während die CLL häufiger bei Männern auftritt, ist die AML bei Frauen gehäuft. Das Risiko an Leukämie zu erkranken, sinkt bei Kindern und Jugendlichen mit steigendem Alter und steigt bei Erwachsenen ab dem 30. Lebensjahr wieder. Durchschnittlich liegt die 5 Jahres Überlebensrate bei einer diagnostizierten Leukämie unter 50%, bei Kindern etwas geringer. Dabei haben Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie, die bereits das 65. Lebensjahr überschritten haben, die schlechteste Prognose (Schmittner 2008). Als Ursache für die Entstehung von Leukämie gelten wie bei vielen anderen Krebsarten verschiedenste Faktoren. Darunter fallen genetische Defekte, Lebensgewohnheiten und der Kontakt mit mutagenen Substanzen (Williams et al. 2014). Wird eine akute Leukämie diagnostiziert, wird möglichst umgehend eine Therapie eingeleitet. Die Behandlung beinhaltet zumeist eine Chemotherapie oder Bestrahlung sowie wenn möglich, eine Knochenmark- oder Stammzelltransplantation. Weitere Therapieoptionen sind Tyrosinkinase-Inhibitoren und auch der Einsatz von monoklonalen Antikörpern wird erforscht (Jabbour et al. 2013, Lipton et al. 2014).

1.8.2 Melanom

Das malignen Melanom, auch nur Melanom oder schwarzer Hautkrebs genannt, ist ein bösartiger Hauttumor. Es entsteht durch die Entartung der pigmentbildenden Hautzellen, den Melanozyten (Bastian 2014). Laut Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in

Deutschland e.V. (GEKID) ist das Melanom mit einer Inzidenz von etwa 15 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner 2010 unter den fünf häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland. Als Risikofaktoren für die Entstehung eines Melanoms gelten Hauttyp I/II nach Fitzpatrick (Andreassi et al. 1999), UV-Strahlung und familiäre Vorbelastung (Goldstein, Tucker 2013). Je nach Größe, Geschwürbildung (Ulzeration) und Metastasierung werden Melanome in verschiedene Stadien eingeteilt (vgl. Tab. 1). In Stadium I bis IIB hat das Melanom eine gute Heilungschance, während die Fünf-Jahres Überlebensrate in Stadium IIC und III nur noch bei knapp 50% liegt. Bei Stadium IV leben nach fünf Jahren lediglich noch 5-10% der Patienten (Balch et al. 2009).

Tabelle 3 Stadien des malignen Melanoms. Nach (Balch et al. 2009) und (Plewig, Braun-Falco 2012)

Stadium	Größe in mm	Ulzeration	Metastasierung
IA	1	/	/
IB	1	ja oder	/
IIA	1 bis max.4	/	/
	1 bis max.2	ja	/
IIB	2 bis max 4	Ja	/
	>4	/	/
IIC	>4	ja	/
IIIA	/	/	mikroskopisch klein in bis zu 3 LK
IIIB	/	ja	mikroskopisch klein in bis zu 3 LK
	/	/	makroskopisch sichtbar in bis zu 3 LK
	/	/	in Tumornähe
IIIC	/	ja	makroskopisch sichtbar in bis zu 3 LK
	/	/	in Tumornähe
	/	ja/nein	makroskopisch sichtbar in mind. 4 LK
	/	ja/nein	LK und tumornah
IV	/	ja/nein	in anderen Organen

Bei früher Erkennung des Melanoms wird der Primärtumor chirurgisch entfernt. Liegt ein metastasiertes Melanomen vor, kann auch dafür, falls möglich, die chirurgische Erntfernung der Metastasen durchgeführt werden (Pflugfelder et al. 2013). Patienten deren Metastasen inoperabel sind, können mit einer systemischen antineoplastischen Therapie (Chemotherapie) behandelt werden. Lange war das Cemotheapeutikum Darcabazin (DTIC), mit einer Ansprechrte von 5-15%, das einzige dafür zugelassene Mittel in Deutschland. Allerdings konnte bisher in keiner randomisierten, kontrollierten Studie eine Verbesserung des Gesamtüberlebens durch DTIC gezeigt werden (Bedikian et al. 2014, Eggermont, Robert

2011). In der jüngeren Vergangenheit erfolgte dann die Zulassung von Ipilimumab, Vemurafenib und Dabrafenib. Diese Therapeutika konnten in randomisierten klinischen Studien eine Verlängerung des Gesamtüberlebens von Patienten mit fortgeschrittenem Melanom zeigen (Hauschild et al. 2012, Hodi et al. 2010, Chapman et al. 2011). Ipilimumab, ein sogenannter Immun-Checkpoint Blocker, macht sich dabei die Eigenschaft des Melanoms zu Nutze, dass Melanomzellen gut durch das autologe Immunsystem erkannt werden können (Boon et al. 2006). Es verstärkt durch die Blockade von CTLA-4, einem inhibierenden Oberflächenrezeptor von T Zellen, die anti-Tumor Immunität (Gajewski et al. 2013).

1.9 Mikrovesikel

Kleine, runde bis ovale, membranumhüllte Abschnürungen von Zellen bezeichnet man als Mikrovesikel (MV). Nahezu alle Zelltypen, in besonders großen Mengen Tumore, exkretieren MV in Blut und andere Körperflüssigkeiten (van Doormaal et al. 2009). Neben MV (oder Mikropartikel zählt man auch Exosomen und apoptotische Körperchen zu den extrazellulären Vesikeln (EV). Sie können anhand ihrer Größe und Membranzusammensetzung unterschieden werden (Gyorgy et al. 2011). Apoptotische Körperchen sind mit einem Durchmesser von 1-5 μM die größten Vesikel. Sie schnüren sich wie der Name verrät im Laufe der Apoptose einer Zelle ab. Die kleinsten Vesikel, die Exosomen, mit einem Durchmesser von 50-100 nm entstehen als intraluminalen Vesikel in Endosomen. Diese intraluminalen Vesikel setzen sich zu Multi Vesicular Bodies (MVBs) zusammen, die ihrerseits mit der Plasmamembran verschmelzen können und so die Exosomen aus der Zelle entlassen (Nagashima et al. 2014). MV hingegen schnüren sich, wie die apoptotischen Vesikel, direkt von der Plasmamembran ab, sind aber mit einem Durchmesser von 100-1000 nm deutlich kleiner als diese (Al-Nedawi et al. 2009). MV werden von gesunden Zellen erst nach Aktivierung von bestimmten Oberflächenrezeptoren generiert, wohingegen in Tumorzellen eine konstitutive Abschnürung stattfinden kann. Die MV-Produktion kann allerdings in Tumorzellen durch Hypoxie oder Nahrungsmangel induziert werden (Gyorgy et al. 2011). Exosomen können hingegen konstitutiv oder nach Induktion (z.B. durch Zytokine) freigesetzt werden, zudem gelten sie in ihrer Größe und Zusammensetzung als deutlich homogener (Huber et al. 2005). Die gegenwärtige Art der Nomenklatur von extrazellulären Vesikeln ist bis dato nicht abschließend standardisiert. Daher nutzen viele Wissenschaftler den Begriff MV für Vesikel, bei denen es sich nach der zuvor beschriebenen Definition aber

um Exosomen handelt. In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um MV nach der an dieser Stelle beschriebenen Definition.

Tabelle 4 Vergleich Exosomen, Mikrovesikel, „apoptotic bodies“.

MVB: *Multi vesiculat body*; PM: Plasmamembran

	Größe	Entstehung	Freisetzung
Exosomen	~ 50 -100 nm	Exozytose von MVB	Konstitutiv oder nach Induktion
Mikrovesikel	~ 100 –1000 nm	Abknospung von der Plasmamembran	Von gesunden Zellen erst nach Induktion, von Tumorzellen konstitutiv oder nach Induktion
„Apoptotic bodies“	~ 1000 – 5000 nm	Abknospung von der PM apoptotischer Zellen	Während der Apoptose

MV und Exosomen beinhalten in ihrer Membran Phospholipide und Proteine der Ursprungsmembran und transportieren weitere Proteine sowie genetisches Material und Signalmoleküle in ihrem Inneren. Dadurch erfüllen sie Aufgaben bei der Zellkommunikation, der Apoptoseregulation, der Modulation des Immunsystems, der Angiogenese und der Koagulation (van Doormaal et al. 2009). MV werden in verschiedenen biologischen Prozessen freigesetzt, dazu zählen Zelldifferenzierung, -aktivierung und Seneszenz. Zusätzlich gibt es biochemische Auslöser, wie Chemotherapeutika oder die Freisetzung von Zytokinen und physische Auslöser, wie Hypoxie oder Stress (z.B. Nahrungsmangel) (Al-edawi et al. 2009, van Doormaal et al. 2009).

Tumorzellen, die MV und Exosomen in Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin abgeben, machen sich die Funktion der Vesikel zu Nutze, um das eigene Wachstum zu stimulieren und der Apoptose zu entgehen sowie für die Induktion der Angiogenese und die Modulation der Immunantwort (Szajnik et al. 2010, Al-Nedawi et al. 2009). Die Effekte von Exosomen auf die Immunantwort sind divers. Sie reichen von der Induktion und Expansion von T Zellen bis zur Apoptoseinduktion in aktivierten T-Lymphozyten (Szajnik et al. 2010, Kim et al. 2005). Für die Zukunft könnten tumor-generierte Vesikel eine wichtige Rolle bei der Diagnose von Krebserkrankungen spielen. Zudem könnten Therapieverfahren entwickelt werden, die gezielt die Interaktion zwischen Immunzellen und Mikrovesikel verändern, sodass die Krebszellen vom Immunsystem erkannt und eliminiert werden können.

1.10 CEACAMs

Adhäsionsmoleküle der CEA-Familie (carcinoembryonic antigen), sogenannte CEACAMs (CEA related Cell Adhesion Molecules), sind Oberflächenmoleküle, die zur Superfamilie der Ig gehören und hoch glykosyliert sind. Humane CEACAMs bestehen aus einer N-terminalen Domäne, die homolog zur variablen Region der Ig ist und aus weiteren 0-6 Domänen, die Homologien zur konstanten Region der Ig zeigen (Singer et al. 2010, Skubitz, Skubitz 2008). CEACAMs können entweder transmembran (CEACAM1 bis 4) oder durch einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker, CEACAM5 bis 8) in der Membran verankert sein. Einige der CEACAMs wie z.B. CEACAM1 und -5 kommen zusätzlich als sekretierte Form vor. GPI-verankerte CEACAMs zeigen eine höhere laterale Beweglichkeit in der Membran, allerdings benötigen sie transmembrane Moleküle wie beispielsweise CEACAM1 zur Signalweiterleitung. CEACAM1 kommt in 13 Isoformen vor, von denen bisher jedoch nur die Isoformen, CEACAM1-3S und -4S mit einer kurzen zytoplasmatischen Domäne und CEACAM1-3L und -4L mit einer langen zytoplasmatischen Domäne als tatsächlich exprimiert gezeigt wurden (Ullrich et al. 2015). Die zytoplasmatische Domäne von CEACAM1-L beinhaltet zwei ITIMs die mit Tyrosinkinasen der Src-Familie, SHP-1, der Insulinrezeptorkinase sowie dem epithelialen Wachstumsfaktor Rezeptor interagieren können und so die Signalweiterleitung vermitteln (Muller et al. 2009, Singer et al. 2010, Slevogt et al. 2008). Für das Auslösen der Signalvermittlung wird ein Ligand benötigt. Dabei können CEACAMs homophile und heterophile Bindungen eingehen. So interagieren CEACAM1 Moleküle sowohl miteinander als auch mit CEA/CEACAM5 sowie CEACAM6 (Obrink 2008) und CEACAM8 (Singer et al. 2014).

CEACAMs werden auf der Oberfläche von Epithelien, angiogenetisch aktiviertem Endothel/Lymphendothel und hämatopoetischen Zellen exprimiert (Singer et al. 2010). Die CEACAM1 Expression ist in aktivierten Granulozyten sowie B- und T Lymphozyten hochreguliert (Singer, Lucka 2005). CEA/CEACAM5 ist ein wichtiger Tumormarker, der in epithelialen Tumoren stark hochreguliert wird (Hammarstrom 1999). Auch CEACAM6 wird in einigen Tumoren hochreguliert, während CEACAM1 je nach Tumorgewebe hoch- sowie herunterreguliert gefunden werden kann (Singer et al. 2010, Obrink 2008). Die Funktion die CEACAMs ausüben, hängt stark vom Wachstums- und Aktivierungsstatus der Zelle ab. Sie können Signale weiterleiten, die je nach Gewebe unterschiedliche Auswirkungen haben können. Darunter fallen die Regulation des Zellzyklus und der Adhäsion, die Aktivierung von Lymphozyten und Neutrophilen, die Angiogenese sowie gegensätzliche Effekte, wie

Tumorsuppression oder –promotion. CEACAM1 reguliert die Reifung von DC sowie B- und T Zellproliferation und –aktivierung. Als Ko-Modulator wurde CEACAM1 sowohl als inhibitorisch sowie auch als kostimulatorisch beschrieben (Gray-Owen, Blumberg 2006, Kammerer et al. 1998, Greicius et al. 2003).

1.11 Zielsetzung der Arbeit

In der dieser Doktorarbeit vorangegangenen Masterarbeit konnte gezeigt werden, dass PBMC von gesunden Spendern in der Lage waren, mit Proliferation auf die alleinige Zugabe von monoklonalem α CD3 Antikörper (CD3 mAk) in Lösung, ohne vorherige Plastikimmobilisierung und ohne zusätzlichen Ko-Stimulus zu reagieren. Dabei induzierten die CD3 mAk des Hybridoms UCHT-1 lediglich bei T Zellen von 41% der gesunden Spender eine Proliferation („Responder“), bei 59% hingegen nicht („Non-Responder“). In den Proben von Leukämiepatienten zeigte sich ein Anteil an „Respondern“ mit über 60% erhöht.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun der molekulare Mechanismus der durch lösliche CD3 mAk induzierten Zellstimulation detailliert analysiert werden. Zu diesem Zweck sollte die Wirkung der beiden CD3 mAk UCHT-1 und OKT3 auf die einzelnen PBMC Subpopulationen, die Proliferations- und Zytokinprofile, sowie die von ihnen induzierten Signaltransduktionswege verglichen werden. Welchen Einfluss eine zusätzliche Ko-Stimulation auf die CD3 mAk induzierten T Zell Stimulation hat sollte mit Hilfe von unterschiedlichen Ko-Stimulazien (α CD28 mAk, MV, CEACAM-1) untersucht werden.

Die wesentliche Herausforderung dieses Projekts war es allerdings zu ergründen a) was die Ursache für den CD3/UCHT-1 Responder/Non-Responder Dimorphismus ist, b) ob es sich hierbei um einen genetischen Effekt oder einen etwa durch Krankheiten erworbenen „Priming“ Effekt der reagierenden PBMC handelt und c) welche pathologischen Konsequenzen der Responder/Non-Responder Status eines z.B. Krebspatienten haben kann. Hierfür soll die Anzahl von 32 zuvor getesteten Probanden/innen und Patienten/innen erhöht und um eine weitere maligne Erkrankung (das Melanom) ergänzt werden. So wird eine statistisch signifikante Aussage dieser vorläufigen Daten ermöglicht.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

Plastik sowie Glasgefäße entsprachen dem allgemeinen Laborstandard.

2.1.1 Geräte

Accuri™ C6 Zytometer	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Bio Photometer	Eppendorf Research, Hamburg
Blot-Dokumentationssystem	Fujifilm LAS 3000
Centrikon® 100 kD Amicon Ultra	Merck Millipore, Darmstadt
ELISA F96Well Mikrotiter Solid Cliniplatten	Thermo Fischer, Braunschweig
FACSCalibur™	BECTON DICKINSON, Heidelberg
FACS-Röhrchen (5ml)	BECTON DICKINSON, Heidelberg
FicollPaque™-Plus	GE Healthcare, Chalfont St Giles (GB)
Fluorospektrometer (Delta Scan Illumination)	Photon Technology International, Unterhaching
Gallios™	Beckmann Coulter, Krefeld
Geldokumentation	INTAS UV-Systems
Heparinmonovetten (S-Monovetten)	SARSTEDT, Nümbrecht
Kryobox, Cool Cell	biocision®, San Rafael (Ca, USA)
Mikrotiterplatte	Techno Plastic Products AG, Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 25 (96 Well, 6 Well Zellkultur)	Tresadingen (CH)
Mikroplatten Spektrometer	TECAN, SUNRISE, Männedorf (CH)
MACS: MS Separation Columns MultiStand MiniMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nanopartikelmessgerät ZetaView®	Particlemetrix GmbH, Meerbusch
Pipetten	Eppendorf Research, Hamburg
Schüttler	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Spannungsquelle	BioRad PowerPac, München
Sterilbank	NUAIRE Biological Safety Cabinet

Zellkulturschalen

Techno Plastic Products AG,
Tresadingen (CH)

Zentrifugen:

Rotina 38R
Mikro 200R
Mikro 200R
Sprout® Mini-Zentrifuge
Ultrazentrifuge L7-65, Rotor SW 40

Hettich Zentrifuge, Tuttlingen
Hettich Zentrifuge, Tuttlingen
Hettich Zentrifuge, Tuttlingen
Biozym, Hessisch Oldendorf
Beckmann Coulter, Krefeld

2.1.2 Antikörper

β-Aktin	Sigma Aldrich (K.-Nr.: A3854)
Be9.2 (Maus-anti-Ratte)	Herstellung <i>in house</i>
CD28	ImmunoTools (K.-Nr: 21330280)
CD3 (Klon UCHT-1)	ImmunoTools (K.-Nr: 21620030)
CD3 (Klon MEM-57)	ImmunoTools (K.-Nr: 21270030)
CD3 (Klon OKT3)	BioLegend (K.-Nr: 317302)
CD3-Biotin (Klon UCHT-1)	BioLegend (K.-Nr: 300403)
CD3-FITC (Klon UCHT-1)	ImmunoTools (K.-Nr.: 21620033)
CD3/CD28 Dynabeads®	Life Technologies™ (K.-Nr.:111.31)
CD4	ImmunoTools (K.-Nr.: 21270040)
CD4-FITC	ImmunoTools (K.-Nr.: 21270043)
CD4-APC	ImmunoTools (K.-Nr.: 21270046)
CD8	ImmunoTools (K.-Nr.: 21270080)
CD8-FITC	ImmunoTools (K.-Nr.: 21270083)
CD8-APC	ImmunoTools (K.-Nr.: 21270086)
CD14	Santa Cruz Biotechnology (Sc-1182)
CD14-PE	ImmunoTools (K.-Nr.: 21620144)
CD16-FITC	ImmunoTools (K.-Nr.: 21279163)
CD19-FITC	ImmunoTools (K.-Nr.: 21810193)
CD19-APC	ImmunoTools (K.-Nr.: 21270196)
CD25-FITC	ImmunoTools (K.-Nr.: 21270253)
CD32	BD Biosciences (K.-Nr.: 555447)
CD56-FITC	ImmunoTools (K.-Nr.: 21270563)

CD64	BD Biosciences (K.-Nr.: 555525)
CD247 Alexa Fluor® 647	BD Biosciences (K.-Nr.: 558489)
CEACAM1 C5-1X	Herstellung <i>in house</i>
5.4 (Ratte-anti-Maus)	Herstellung <i>in house</i>
Interleukin-2	ImmunoTools (K.-Nr.: 21170021)
Kaninchen-Anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch (K.-Nr.: 315-006-045)
Phospho p38 MAP Kinase	Cell Signaling Technology (K.-Nr.: 9211)
Phospho p44/42 (Erk 1/2)	Cell Signaling Technology (K.-Nr.: 9101)
Phospho pSAPK/JNK	Cell Signaling Technology (K.-Nr.: 9255)
Phosphor Zap70	Millipore (K.-Nr.:06-1303)
Rekombinantes humanes IL-2 Protein	ImmunoTools (K.-Nr.: 11340025)
Ziege-Anti-Maus-FITC	Jackson ImmunoResearch (K.-Nr.: 115-096-062)
Ziege-Anti-Maus-HRP	Dako (K.-Nr.:P0447)

2.1.3 Kommerzielle Reaktionssysteme

Amersham Cell Proliferation Biotrak	GE Healthcare, Solingen
ELISA System, Version 2“ (kolorimetrisch)	
BrdU-Proliferationselisa (kolorimetrisch)	Roche Life Science, Basel (CH)
CFSE Proliferationsassay (CellTrace™)	Thermo Fisher Scientific, Oberhausen
Flow Cytomix human Th13plex	eBiosciences, San Diego (USA)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Quiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
T Cell Signaling Antibody Sampler Kit	Cell Signaling, Danvers (USA)
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Madison (USA)

2.1.4 Chemikalien

Albumin Fraction V (BSA)	Applichem (K.-Nr.: A1391)
Aqua ad iniectabilia	Braun (K.-Nr.: 2351744)
Agarose LE	Biozym (K.-Nr.: 840004)
DAPI	Serva (K.-Nr.: 18860)
DMEM	Gibco, Life Technologies™ (K.-Nr.: 41966)
DMEM ohne Phenolrot	Gibco, Life Technologies™ (K.-Nr.: 31053)
Dynabeads® Protein G	Life Technologies™ (K.-Nr.: 10003D)
EDTA	Sigma Aldrich (K.-Nr.: E6758)
FCS	Gibco, Life Technologies™
Fura-2,AM	Life Technologies™ (K.-Nr.: F-1225)
GelRED™	Biotrend (K.-Nr.: 41003)
G418	Biochrom (K.-Nr.: A291)
<u>Inhibitoren</u>	
p38 SB 203580	Sigma Aldrich (K.-Nr.: S8307)
NF-κB Bay 11-7082	Sigma Aldrich (K.-Nr.: B5556)
NF-κB Bay 11-7085	Sigma Aldrich (K.-Nr.: B5681)
NF-κB Bay Honokiol	Tocris Biosciences (K.-Nr.: 4590)
JNK SP 600125	Sigma Aldrich (K.-Nr.: S5567)
PI3K LY 294002	Cell Signaling (K.-Nr.: 9901)
AKT MK 2206	Selleckchem (K.-Nr.: S1078)
KH ₂ PO ₄	Merck (K.-Nr.: 4873)
L-Glutamin	Gibco, Life Technologies™ (K.-Nr.: 25030)
Lipofectamine® 2000	Life Technologies (K.-Nr.:3000001)
NaCl	Merck (K.-Nr.: 6400)
Na ₂ HPO ₄	Riedel de Häen (K.-Nr.: 30427)
Natrium-Desoxycholate	Sigma Aldrich (K.-Nr.: D6750)
Natriumfluorid	Merck (K.-Nr.: 106449)
Natriumpyruvat	Gibco, Life Technologies™ (K.-Nr.: 11360)

Orthovanadat	Sigma Aldrich (K.-Nr.: S6508)
PBS (Dulbecco's) (1x)	Gibco, Life Technologies™ (K.-Nr.: 14190)
Penicillin, Streptomycin	Gibco, Life Technologies™ (K.-Nr.: 15140)
Pluronic® F-127	Molecular Probes, Life Technologies™ (K.-Nr.: P-3000MP)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (K.-Nr.: P3504)
Propidium Iodid	Sigma Aldrich (K.-Nr.: P4864)
Proteinstandard	AppliChem (K.-Nr.: A8889,0500)
Restriktionsenzyme:	
Bsh1236I (fast digest)	Thermo Scientific (K.-Nr.: FD0924)
EcoRI (fast digest)	Thermo Scientific (K.-Nr.: FD0274)
XhoI (fast digest)	Thermo Scientific (K.-Nr.: FD0694)
RPMI	Gibco, Life Technologies™ (K.-Nr.: 21875)
Streptavidin	Sigma Aldrich (K.-Nr.: S4762)
TMB X-tra (ready to use substrate)	Kementec Diagnostics, Biotrend (K.-Nr.: 48002)
Triton X-100	Sigma (K.-Nr.: T9284)
Vectorshield®	VectorLab (K.-Nr.: H-1200)

Weitere in dieser Arbeit genutzte Chemikalien, die zum Laborstandard zählen, wurden von Roth, AppliChem oder Sigma Aldrich bezogen.

2.1.5 Software

BD Cellquest pro	Becton Dickinson
FeliX32™ Spectroscopy	Photon Technology International
R	The R Foundation for Statistical Computing
ApE (A plasmid editor)	M. Wayne Davis

2.1.6 Primer

PCR-Primer

Name	Sequenz 5'-3'	T _m [C°]	Größe des amplifizierten Fragments
CD32a Polymorphismus sense antisense	GGAAAATCCCAGAAATTCTCGC CAACAGCCTGACTACCTATTACGCGGG	53 63	366 bp
CD32a Klonierung Sense XhoI Antisense EcoRI	CACAGTCTCGAGATGACTATGGAGACC TCCCGTGAATTCCTAGTTATTACTGTTGACATG	61 59	1016 bp

Sequenzierprimer: T7Prom „forward“ Primer und BGH „backward“ Primer wurden von LGC Genomics (Berlin) bei der Sequenzierung mitbestellt.

2.1.7 E.Coli Stamm

DH5 α TM: F- Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44* λ - *thi-1 gyrA96 relA1*

2.1.8 Zelllinien

CHO: Chinese hamster ovary; Organismus: *Cricetulus griseus*; Gewebe: Ovar; Geschlecht: weiblich; Morphologie: epithelial; Wachstumseigenschaften: adhärent.

CHO-CEACAM1: siehe (Muturi et al. 2013)

HT29: Human Tumor 29; Organismus: *homo sapiens*; Gewebe: Kolon; Krankheit: Adenokarzinom; Geschlecht: weiblich; Morphologie: epithelial; Wachstumseigenschaften: adhärent.

Jurkat: Organismus: *homo sapiens*; Gewebe: peripheres Blut, T Lymphozyten; Krankheit: akute lymphatische Leukämie, Geschlecht: männlich; Morphologie: lymphoid; Wachstumseigenschaften: Suspension.

Anmerkung: Zum Ende der praktischen Arbeit wurde gezeigt, dass diese Zelllinie mit intrazellulären Mykoplasmen infiziert ist.

NBTII: Nara Bladder tumor No. 2; Organismus: Rattus norvegicus (Wistar); Gewebe: Harnblase; Krankheit: Tumor; Geschlecht: männlich; Morphologie: epithelial; Wachstumseigenschaften: adhärent.

2.1.9 Medien, Lösungen, Puffer

PBMC-Vollmedium: 1x RPMI
(Suspensionszellen) 10% FCS (hitzeinaktiviert)
2 mM L-Glutamin
100 U/ml-100 µg/ml Penicillin Streptomycin
1 mM Na-Pyruvat

Kultivierungsmedium: 1x DMEM
(adhärente Zelllinien) 10% FCS (hitzeinaktiviert)
2 mM L-Glutamin
100 U/ml-100 µg/ml Penicillin Streptomycin

Selektionsmedium: Kultivierungsmedium Medium
1 mg/ml G418

Starvierungsmedium: 1x DMEM
2 mM L-Glutamin
100 U/ml-100 µg/ml Penicillin Streptomycin
1 mM Na-Pyruvat

Die Hitzeinaktivierung des FCS erfolgte für 30 min bei 56°C im Wasserbad

FACS-Puffer: Kultivierungsmedium 1:3 mit PBS verdünnt

Propidiumiodid (PI)-Puffer: 1 mg/ml PI 1:200 in DMEM verdünnen

TBE-Puffer, 5x (Agarosegel):

54 g	Tris
27,5 g	Borsäure
20 ml	0,5 M EDTA (pH 8)

→ 1 Liter aqua dest.

6x OrangeG DNA Loading buffer:

10 mM Tris-HCl, pH 7.6
60% Glycerol
60 mM EDTA
0,15% Orange G

<u>RIPA-Puffer:</u>	1% Triton X-100	Phosphatpuffer (0,01 M):
	1% Natrium-Desoxycholate	0,41 g KH ₂ PO ₄
	0,1% SDS	1,25 g Na ₂ HPO ₄
	0,15 M NaCl	→ a.d. 250 ml aqua dest.
	2 mM EDTA	
	50 mM Natriumfluorid	
	0,01 M Phosphatpuffer	

→ Einstellen auf pH 7,2 mit 1 N NaOH

→ Steril filtrieren

Lysepuffer (Dong et al. 2010):

Tris (pH 7.5)	20 mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂	1 mM
EGTA	1 mM
NaF	50 mM
Na ₄ P ₂ O ₇	10 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
NP-40	1%
n-dodecyl-β-D-maltoside	1%

Pervanadat: 4 µl Orthovanadat (0,1 M) + 1 µl H₂O₂ (30%)

HS Stammlösung (2x): 135 mM NaCl

5 mM KCL

1 mM MgCl₂

2 mM CaCl₂

→ ad 1 L mit Wasser

→ mind. 1 Monat haltbar

HS Gebrauchslösung: 1x HS Stammlösung

5 mM Glucose

20 mM HEPES

10 mM Lactat

1 mM Pyruvat

→ ad 200 ml mit Wasser

→ pH 7,4 mit NaOH

→ täglich frisch ansetzen

Western Blot:

1x Gelpuffer

1,5 g (0,3%) SDS

181,7 g (3M) Tris-HCL pH 8.45

→a.d. 500 ml mit Wasser

5x Lämmli-Puffer

312,5 mM Tris-HCL pH 6.8

50% (v/v) Glycerol

10% (w/v) SDS

0,05% (w/v) Bromphenol-Blau

1x Kathodenpuffer

17,92 g (0,1M) Tricin

1 g (0,1 M) SDS

12,11 g (0,1M) Tris-HCL pH 8.3

→a.d. 1 L mit Wasser

1x Anodenpuffer

24,23 g (0,2 M) Tris-HCL pH 8.9

→a.d. 1 L mit Wasser

1x Blotpuffer

10 g (133 mM) Glycin

1,5 g (12 mM) Tris pH 8.4

→a.d. 1 L mit Wasser

Entwicklerlösung

Lösung A 15 µl

Lösung B 1 µl

Lösung C 3 µl

Lösung A:

6,8 mM p-Coumarsäure

→ a.d. 100 ml mit DMSO

Lagerung: -20°C

Lösung B:

1,25 mM Luminol

0,1 M Tris-HCl, pH 8,5

→ a.d. 1 L mit Wasser

Lagerung: -20°C

Lösung C:

10 µl 30% H₂O₂

90 µl H₂O

frisch ansetzen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

CHO sowie Jurkat Zellen wurden in 25 cm² Gewebekulturflaschen in 10-20 ml Zellkulturmedium (Jurkat: PBMC-Vollmedium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂) kultiviert. Bei den CHO Zellen wurde alle drei bis vier Tage (Konfluenz max. 80%) ein Mediumwechsel vorgenommen. Wurde die maximale Konfluenz der Zellen überschritten, wurden die Zellen von Medium befreit, zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend für ca. 5 min mit 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Dieser Vorgang wurde mit etwa 18 ml Medium abgestoppt. Diese Zellsuspension wurde 1:10 mit frischem Kultivierungsmedium verdünnt. Die Suspensionszelllinie Jurkat konnte direkt durch eine 1:10 Verdünnung in frischem PBMC-Vollmedium reduziert werden. Um die Zellen auf eine Mykoplasmenkontamination zu testen, wurden adhärent gewachsene Zellen auf einem Deckglas 15 min mit Methanol fixiert und mit dem DNA bindenden Fluorochrom DAPI (5 µg/ml, 1:200 Methanol) angefärbt. Nach zweimaligem waschen mit PBS und Aqua dest., wurden die gefärbten Zellen mit Vectorshield® eingedeckt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Da Suspensionszellen nicht auf Deckgläsern wachsen können, wurden sie für drei Tage mit einer Mykoplasmen-freien, adhärenenten Indikatorzelllinie ko-kultiviert. Da während dieser Zeit Mykoplasmen von der zu untersuchenden Zelllinie auf die Indikatorzelllinie übergehen würden, konnte der Mykoplasmentest mit der adhärenenten Zelllinie durchgeführt werden.

2.2.2 Handhabung humaner Blutproben

Für die Versuche wurde Blut von gesunden Kontrollpersonen, von Leukämie erkrankten Patienten der Knochenmarktransplantation (KMT) sowie Melanompatienten aus der Hautklinik genutzt. Zur Gewinnung der weißen Blutzellen und des Blutplasma wurde das Blut in Heparinmonovetten aufgenommen. Das Heparin verhindert eine Blutgerinnung und wurde dem oft genutzten EDTA vorgezogen, da es keinen Einfluss auf den Kalziumhaushalt der Zellen ausübt. Wird durch EDTA das Kalzium der Zellen komplexiert, kann die Zugabe von kalziumhaltigem Medium bereits zu einer unspezifischen Aktivierung der Zellen führen. Da das in den Versuchen genutzt Medium Kalzium enthält, wurde Heparin verwendet, welches die Gerinnung hemmt, indem es die Wirkung des Antithrombin III vertausendfacht (Neumann 2008).

Für die Arbeiten mit gesunden (12-5076-BO) humanen Blutproben, lag ein Votum der Ethikkommission des Universitätsklinikum Essen vor. Die in dieser Studie eingeschlossenen Probanden und Patienten waren zwischen 30 und 84 Jahre alt.

Tabelle 5 Daten Kontrollgruppe

		Gesunde Probanden	Responder	Non-Responder
N		101 (100%)	60 (59%)	41 (41%)
Geschlecht	weiblich	50 (50%)	21 (35%)	29 (71%)
	männlich	51 (50%)	39 (65%)	12 (29%)
Alter (MW)				
	alle	43,5 Jahre	43,5 Jahre	43 Jahre
	weiblich	44	43	45
	männlich	43	44	39
Alter (Median)				
	alle	45,5 Jahre	46 Jahre	45,5 Jahre
	weiblich	45	44	47
	männlich	46	46,5	34
CD32a Genotyp				
	unbekannt	51 (50%)	29 (61%)	22 (39%)
	R/R	7 (7%)	7 (100%)	0 (0%)
	R/H	24 (24%)	24 (100%)	0 (0%)
	H/H	19 (19%)	0 (100%)	19 (100%)

Tabelle 6 Daten Melanompatienten

		Melanom Patienten	Responder	Non-Responder
n		102 (100%)	76 (75%)	26 (25%)
Geschlecht	weiblich	56 (55%)	42 (55%)	14 (53.8%)
	männlich	46 (45%)	34 (45%)	12 (46.2%)
Alter (MW)				
	alle	58 Jahre	61 Jahre	53 Jahre
	weiblich	57	59	42
	männlich	61	63	55
Alter (Median)				
	alle	59 Jahre	60 Jahre	53 Jahre
	weiblich	58	59	47
	männlich	63	63,5	59
Tumorstadium				
	Stadium I	18 (18%)	12 (16%)	6 (23%)
	Stadium II	10 (10%)	8 (10%)	2 (7%)
	Stadium III	36 (35%)	27 (35%)	9 (35%)
	Stadium IV	38 (39%)	29 (39%)	9 (35%)
CD32a Genotyp				
	unbekannt	23 (23%)	16 (69%)	7 (30%)
	R/R	16 (16%)	15 (94%)	1 (6%)
	R/H	43 (42%)	43 (100%)	0 (0%)
	H/H	20 (20%)	2 (10%)	18 (90%)

Die Verteilung des CD32a Genotyps entspricht dem Hardy-Weinberg Gleichgewicht (Kontrolle: $p = 0,89$, Melanom: $p = 0,42$).

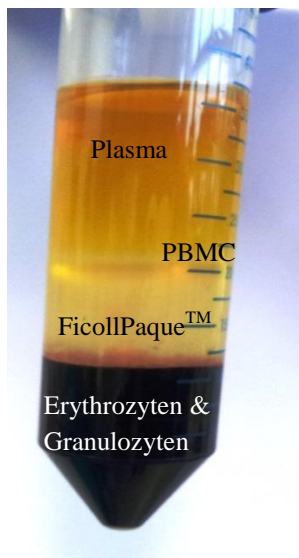
Tabelle 7 Daten Leukämiepatienten

		Leukämie Patienten	Responder	Non-Responder
n		83	49 (59%)	34 (41%)
Geschlecht	weiblich	47 (57%)	30 (61%)	17 (50%)
	männlich	36 (43%)	19 (39%)	17 (50%)
Alter (MW)				
	alle	54 Jahre	54 Jahre	53 Jahre
	weiblich	51	52	54
	männlich	54	58	52
Alter (Median)				
	alle	53 Jahre	53 Jahre	54 Jahre
	weiblich	52	52	54
	männlich	55	57	55
Leukämieform				
	Unbekannt	33 (40%)	16 (33%)	17 (50%)
	AML	35 (42%)	25 (51%)	10 (29%)
	CML	6 (7%)	4 (8%)	2 (6%)
	ALL	3 (4%)	2 (4%)	1 (3%)
	Sonstiges	6 (7%)	2 (4%)	4 (12%)

Bei den Leukämieproben wurden für die letzten 23 Patienten bewusst AML Patienten ausgesucht. Da der Stichprobenumfang für AML Patienten zu gering ist wurden dennoch alle getesteten Patienten in die Auswertung mit einbezogen. Unter Sonstige Leukämieformen zählen das Myelodysplastische Syndrom (MSD), das Multiple Myelom (MM), die Osteomyelofibrose (OMF) und das Non-Hodgkin Lymphom (NHL).

2.2.3 PBMC-Isolation

Für die Isolation von PBMC wurden bis zu 50 ml Heparin-Blut verwendet. Daraus ließen sich je nach Proband $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml Vollblut isolieren. Proben mit weniger als 10 ml Heparin-Blut wurden vorsichtig auf eine 4 ml FicollPaque™-Schicht aufgetragen, bei 20-30 ml Heparin-Blut wurde eine 15 ml FicollPaque™-Schicht genutzt (40 ml oder mehr Blut wurde zu gleichen Teilen auf jeweils 10ml FicollPaque™ geschichtet). Anschließend wurde



für 30 min bei $1600 \times g$ zentrifugiert. Die Zentrifugation fand bei Raumtemperatur (RT) statt und die Bremse der Zentrifuge wurde dabei ausgestellt. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde die oberste Schicht auf dem Gradienten, die aus Plasma bestand, abgenommen und verworfen. Die darunter liegende Schicht aus PBMC wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Der Gradient bestand anschließend lediglich aus einer FicollPaque™ -Schicht mit einer darunterliegenden Schicht an polymorphonukleären Zellen (PMN = Granulozyten) und Erythrozyten (siehe Abb. 3). Im Folgenden wurde das Gefäß mit

Abbildung 3 Vollblutgradient auf Ficoll. Auf eine Schicht polymorphonukleärer Zellen am Boden des Zentrifugationsgefäß folgt eine Grenzschrift aus Ficoll auf der die mononukleären Zellen, die PBMC liegen. Darüber befindet sich das Blutplasma. Nach http://umfacts.um.edu.my/gallery/index.php?menu=research_details&cid

den PBMC mit PBS aufgefüllt und 10 min bei $710 \times g$ und RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand des PBMC-Zellpellets verworfen. Das Zellpellet wird in 1 ml PBS resuspendiert. Befanden sich augenscheinlich viele Erythrozyten in dem Zellpellet, konnten diese durch eine kurze Behandlung mit destilliertem, sterilem H_2O lysiert werden. Dazu wurde das Pellet in 1,5 ml Wasser resuspendiert und nach etwa 10 Sek mit 20 ml PBS neutralisiert. Für einen weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Gefäß erneut mit PBS aufgefüllt und für 5 min bei $710 \times g$ und RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet je nach Größe (Anzahl der Zellen) in 1-3 ml PBMC-Vollmedium resuspendiert, so dass eine homogene Zellsuspension entstand.

Bei der Isolation der Patientenproben wurde keine osmotische Lyse durchgeführt, da in diesen Fällen die isolierte PBMC-Probe unter keinen Umständen verfälscht werden sollte.

2.2.4 Manuelle mikroskopische Zellzählung

Nach gründlicher Resuspension wurde die homogene, milchige PBMC-Zellsuspension mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Zur Vorbereitung der Zählkammer wurde das Deckglas mit leichtem Druck von vorn auf die Stege der Kammer aufgeschoben. Zwischen Deckglas und Steg zeigten sich regenbogenfarbene Newtonsche Ringe. Diese sind wichtig, um das für diese Methode definierte Volumen in der Zellkammer zu erreichen.

Für die aus dem Vollblut isolierten PBMC wurde eine 1:100 Verdünnung genutzt (z.B. 10 µl PBMC + 990 µl PBS) von der 10 µl zwischen Zählkammer und Deckgläschen gegeben wurden. Die Zellen aus vier Eckquadrate der Neubauerkammer wurden unterm Mikroskop gezählt und ein Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert wurde dann mit 10^6 multipliziert ($\times 100$ Verdünnungsfaktor, $\times 10^4$ Faktor der Neubauerkammer) um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

2.2.5 Monozyten-Reduktion

Um die Monozyten aus der PBMC Zellsuspension zu reduzieren, wurden sie mittels Magnetic activated cell sorting (MACS) isoliert. Bei der Methode des MACS wurden die Monozyten mit Hilfe von magnetisch gekoppelten Antikörpern isoliert. Zu diesem Zweck wurden $10-15 \times 10^6$ PBMC in 200-600 µl Medium zunächst mit etwa 1 µg/ml CD14 Antikörper inkubiert. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf Eis wurden 1,5 mg/ml eines magnetisch gekoppelten Protein G Antikörpers. Das Protein G erkennt die Fc-Region vom Immunglobulin des CD14 Antikörpers und bindet daran. Das Ganze wurde für 30 min auf einem Drehrad inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Säule zur magnetischen Auftrennung in der dafür vorgesehenen Einrichtung befestigt und zwei Mal equilibriert. Dazu wurden je 500 µl PBS auf die Säule gegeben. Das PBS passierte durch Gravitation die Säule und konnte anschließend verworfen werden. Nach der Inkubation wurde die Probe auf die Säule gegeben und unterhalb der Säule in einem neuen Gefäß aufgefangen. Die Säule wurde anschließend noch 2 Mal mit 500 µl PBS gewaschen, welches ebenfalls im Auffanggefäß landete.

Im verengten Teil der Säule befinden sich ferromagnetische Bereiche. Durch die direkte Nähe zum MACS-Separator (Magnet) wird das Magnetfeld innerhalb der Säule um das 10.000 fache erhöht und es entsteht ein hoher magnetischer Gradient innerhalb der Säule. In diesem Gradient werden selbst schwach magnetisch markierte Zellen zurückgehalten, während unmarkierte Zellen die Säule problemlos passieren können. Daher sollten die CD14-ProteinG-markierten Monozyten in der Säule zurückgehalten und aus der Probe

entfernt worden sein. Die Monozyten-reduzierte Probe wurde 3 min bei 250 x g und RT zentrifugiert, in 500 µl PBMC-Vollmedium aufgenommen und anschließend gezählt. Der Erfolg der Depletion wurde mittels durchflusszytometrischer Messung (Met. 2.3.3) bestimmt.

2.2.6 Nachweismethoden für Zellproliferation

2.2.6.1 BrdU-Assay

5-bromo-2'deoxyuridin (BrdU) ist ein nicht radioaktives Analogon des DNA Nucleotids Thymidin. Teilt sich eine Zelle in Gegenwart von BrdU, so wird es teilweise anstelle des Thymidin in die sich replizierende DNA eingebaut. Durch den immunologischen Nachweis des BrdU kann die Proliferation einer Zelle quantifiziert werden. Der Assay wurde gemäß den Protokollen der jeweiligen BrdU Reaktionssystemen durchgeführt. Das Protokoll des Proliferationstests der Firma Roche unterschied sich nur durch den Verzicht eines Blockierungsschrittes von dem Test der Firma GE Healthcare. Mit beiden Kits konnten verlässliche und vergleichbare Ergebnisse erzielt werden.

Die verschiedenen Zellansätze wurden insgesamt drei Tage lang inkubiert. 18-20 h vor der Messung wurde BrdU zugefügt. Deshalb bauten alle proliferierenden Zellen innerhalb dieser 18-20 h Inkubation das BrdU in die neu synthetisierte DNA ein. Dann wurden die Zellen für den immunologischen Nachweis des eingebauten BrdU zentrifugiert (5 min, 710 x g, RT) und anschließend fixiert. Dabei wurden die Zellmembran und der Zellkern permeabilisiert, wodurch die DNA zugänglich wurde. Nach einem optionalen Blockierungsschritt zur Verhinderung unspezifischer Bindungen, wurde das eingebaute BrdU durch einen Peroxidase-markierten anti-BrdU Antikörper markiert. Die Peroxidase setzte im nächsten Schritt das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) um, wodurch eine Blaufärbung entstand. Diese Reaktion wurde nach der Entwicklung eines kräftigen Blautons (ca. 5-15 min) mit Schwefelsäure abgestoppt, wodurch sich ein stabiler Komplex bildete, der durch einen Farbumschlag ins Gelbe auffiel. Durch eine kolorimetrische Messung der Proben bei OD_{450nm} (abzüglich der Referenz OD_{620nm}) im Mikroplatten-Spektrophotometer konnte so die Proliferation der Zellen ermittelt werden. Dabei war die Gelbfärbung direkt proportional zur Anzahl der Zellen, die BrdU eingebaut hatten und somit proliferiert waren.

Im Gegensatz zu den in den Firmen-Protokollen angegebenen 300 x g wurden die Mikrotiterplatte mit 710 x g zentrifugiert, wodurch ein kräftigeres Ausschlagen der Platte und dadurch eine geringere Trocknungszeit der Zellen erzielt werden konnte. Zudem wurde die Inkubationszeit des HRP gekoppelten anti-BrdU Antikörpers verkürzt, da bereits nach einer

50 bis 60 minütigen Inkubation gute Ergebnisse erzielt wurden.

2.2.6.2 CFSE Assay

Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) ist ein fluoreszierender Zellmarker. Im nicht-fluoreszierenden Zustand kann Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE), häufig ebenfalls als CFSE bezeichnet, die Zellmembran passieren und so in die Zelle diffundieren. Im Zytosol der Zelle spalten zelleigene Esterasen die Acetylgruppen des Moleküls, wodurch eine fluoreszierende Form des CFSE entsteht. Diese Form bindet kovalent an freie Amine von Proteinen. Dadurch wird das CFSE in der Zelle festgehalten. Eine CFSE markierte Zelle kann mit einem Durchflusszytometer detektiert werden. Ein Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm kann die CFSE Moleküle anregen, welche ein Emmissionsmaximum von etwa 520 nm haben. Teilt sich eine Zelle, die eine bestimmte Menge CFSE im Zytosol hat, so wird das CFSE zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben. Die Zellteilung korreliert also mit der Verringerung des CFSE Signals und kann daher durchflusszytometrisch gemessen werden.

Für die Versuche wurden die PBMC in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ ml in PBS mit 0,1% BSA aufgenommen. Es wurde 2 μ M CFSE zu den Zellen gegeben, gemischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das fünffache Volumen eiskaltes PBMC-Vollmedium zugegeben und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die so CFSE-markierten Zellen konnten, wie die frisch isolierten PBMC, weiter für die verschiedenen Versuchsansätze verwendet werden.

Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass mit weiteren Farbstoffen (z.B. PE oder APC) zusätzlich zur Zellteilung auch Oberflächenmarker der Zellen gefärbt werden können. So ist es möglich die Proliferation definierter Zellpopulationen zu analysieren.

2.2.6.3 Stimulationsansätze

Die Zellen für den Proliferationstest wurden in 96Well Platten (Zellkultur-Mikrotiterplatten) in Triplikaten ausgesät. Da jeder Ansatz aus Triplikaten bestand, konnte eine Fehlinterpretation durch ausreißende Werte minimiert werden. Bei den Versuchen wurden jeweils zwei Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle dienten zum einen die Zellkontrolle, in der die Zellen über drei Tage ohne zusätzlichen Stimulus inkubiert wurden und zum anderen die Isotypkontrolle (IgG) für die der *in house* hergestellte

Antikörper Be9.2 (IgG1) genutzt wurde. Dieser Antikörper bindet ausschließlich an CEACAM1 der Ratte und sollte somit keinen Effekt auf humanen Zellen haben. Neben dem IgG1 Antikörper Be9.2 wurde ebenfalls der Antikörper 5.4 genutzt, der die gleiche Funktion wie Be9.2 ausübt, allerdings ein IgG2a Antikörper ist. Mit dieser Isotypkontrolle wurde ausgeschlossen, dass die bloße Anwesenheit eines Antikörpers einen Einfluss auf die zellulären Reaktionen der Ansätze hat. Als Positivkontrolle wurde eine Stimulation mit IL-2 genutzt. Naive T Lymphozyten reagieren mit Proliferation auf die Zugabe von großen Mengen exogenem IL-2, weshalb in dieser Arbeit mit einer Konzentration von 500 U/ml gearbeitet wurde. Das verwendete Volumen in den 96er Flachbodenplatten lag bei 100 µl/Well. Zellen und Antikörper wurden jeweils in einem Volumen von 25 µl den Wells hinzugefügt. Die isolierten und wenn nötig Monozyten-reduzierten PBMC wurden in PBMC-Vollmedium so verdünnt, dass sie die jeweils gewünschte Zellzahl pro 25 µl enthielten. Die Zellzahl betrug (sofern nicht anders angegeben) 160.000 Zellen/Well. Die Antikörper wurden ebenfalls in PBMC-Vollmedium verdünnt. Dabei wurde für CD3 (UCHT-1 und OKT) eine Konzentration von 125 ng/ml genutzt (sofern nicht anders angegeben) und von CD28 eine Konzentration von 250 ng/ml. Der Kaninchenantikörper gegen Maus IgG wurde mit 5 µg/ml eingesetzt.

Um die Spontanreaktion des Substrates mit z.B. Luftsauerstoff zu bestimmen wurden auf jeder Platte jeweils drei Wells mit 100 µl PBMC-Vollmedium versehen und parallel mit den Testansätzen inkubiert. Der dadurch erhaltene „Blank“-Wert wurde dann von den „Proben“-Werten abgezogen. Das Ergebnis der Stimulation wurde durch die Messung der Proliferation mittels BrdU dargestellt. Es wurden die OD_{450nm} Mittelwerte der Triplikate und deren Standardabweichungen errechnet und entsprechende Balkendiagramme als Ergebnisübersicht angefertigt.

2.2.6.3.1 Rechenexempel

Eine T Zelle besitzt etwa 124 CD3-Rezeptoren auf der Oberfläche (Ginaldi et al. 1996). Das macht bei 160×10^3 Zellen pro Well knapp 20×10^6 CD3 Rezeptoren. Da hier mit PBMC anstelle von reinen T Zellen gearbeitet wurde, bestehen die PBMC zu maximal 80% aus T Zellen. Daher kann von etwa 16×10^6 CD3 Rezeptoren pro Well ausgegangen werden. Die ε-Untereinheit an die CD3/UCHT-1 und CD3/OKT3 binden kommt allerdings zwei Mal pro CD3 Molekül vor, weshalb hier von etwa 32 Millionen CD3 mAb Bindungsstellen in einem Ansatz ausgegangen werden kann. Ein IgG Molekül hat ein Molekulargewicht von 150 Kilo

Dalton oder $1,5 \times 10^{11} \mu\text{g/mol}$. Mit der Avogadro-Konstante $6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$, die angibt wie viele Moleküle eines bestimmten Stoffes pro Mol enthalten sind, lässt sich nun die Anzahl an eingesetzten CD3 mAk Molekülen berechnen:

$$\text{Stoffmenge} = \frac{12,5 \text{ ng}}{1,5 \times 10^{15} \mu\text{g/mol}} = 8,34 \times 10^{-15} \text{ mol}$$

$$\text{Anzahl der Moleküle} = 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1} \times 8,34 \times 10^{-15} \text{ mol} = 5,02 \times 10^9$$

Beim Einsatz von 125 ng CD3 mAk wurden demnach 5 Milliarden CD3 Moleküle eingesetzt. Bei 160×10^3 Zellen wurden theoretisch 150 Mal mehr CD3 mAk Moleküle eingesetzt als CD3 Bindungsstellen in dem Ansatz vorhanden sind.

2.2.6.3.2 Inhibition von Signalmolekülen

Für die Versuche zu den Signalwegen wurden die Zellen in einem Volumen von 50-100 μl mit dem jeweiligen Inhibitor (siehe Tab. 8) für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Tabelle 8 Inhibitoren der TZR Signalproteine

Signalprotein	Inhibitor	Konzentration (in μM)	Funktion
p38	SB 203580	3; 10	verhindert katalytische Aktivität des p38 durch Blockierung der ATP Bindungsstelle
NF- κB	Bay 11-7082	3,5; 5	verhindert DNA Bindung von NF κB (Mori et al. 2002)
NF- κB	Bay 11-7085	10	verhindert Dissoziation des NF κB inaktivierenden I κB
NF- κB	Honokiol	3; 5; 8; 10	Verhindert Dissoziation des NF κB inaktivierenden I κB
JNK	SP 600125	4; 6,5; 8,25; 10; 12,5; 25	verhindert Phosphorylierung von c-Jun.
PI3K	LY 294002	1; 1,4; 5; 10	verhindert katalytische Aktivität des p38 durch Blockierung der ATP Bindungsstelle
AKT	MK 2206	1,4; 2; 5; 10	Verhindert die Auto-Phosphorylierung von Akt sowie die Akt-vermittelte Phosphorylierung von nachgeschalteten Signalmolekülen

Anschließend wurde die Zellstimulation wie zuvor beschrieben fortgeführt.

2.2.6.3.3 Dosis-Wirkungskurve und Bindungsassay

Für die Dosis-Wirkungskurve wurden 160.000 Zellen/Ansatz in 100 µl Vollmedium mit 0 ng/ml bis 250 ng/ml der CD3 Antikörper (UCHT-1 und OKT3) inkubiert und durch einen BrdU-Assay auf ihre Proliferation hin untersucht. Für den Bindungsassay wurden 160.000 Zellen für 30 min mit 0 µg/ml – 10 µg/ml der CD3 Antikörper (UCHT-1 und OKT3) stimuliert und anschließend zwei Mal mit PBS gewaschen bevor sie für 30 min mit anti-Maus-FITC Antikörper inkubiert wurden. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen im Durchflusszytometer gemessen (siehe 2.2.14).

2.2.7 Re-Stimulationsversuche

Um die Re-Stimulierbarkeit der Zellen nach einer dreitägigen Inkubationszeit zu testen, wurden 15-20 x 10⁶ Zellen/Well in einer 6 Well Platte ausgesät. Die Antikörperkonzentration der CD3 Klon blieb bei 125 µg/ml und die Zellen wurden insgesamt in 3 ml PBMC-Vollmedium inkubiert. Nach einer dreitägigen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen auf etwa 4 ml FicollPaqueTM geschichtet. Während einer 30 minütigen Zentrifugation bei RT, 1600 x g, ohne Bremse, konnten die lebenden von den toten Zellen getrennt werden, da tote PBMC eine höhere Dichte aufweisen. Somit passierten abgestorbene Zellen während der Zentrifugation das FicollPaqueTM und endeten im Pellet. Wie bei der Isolation aus Vollblut (Met. 2.2.3) zeigte sich an der oberen Grenzschicht des FicollPaqueTM ein Ring bestehend aus lebenden PBMC. Dieser wurde abgenommen, zwei Mal mit PBS gewaschen (10 min, 710 x g, RT), in PBMC-Vollmedium resuspendiert und gezählt. Anschließend wurden die Zellen in einer 96 Well Platte ausgesät und für weitere drei Tage in verschiedenen Ansätzen inkubiert.

2.2.8 Immobilisierung

Die CD3 Antikörper wurden am Plattenboden der für die BrdU-Tests genutzten 96-Well Platten immobilisiert. In Doppel- bis Dreifachansätzen wurden die Antikörper in einer Konzentration von 5 µg/ml in einem Volumen von 40 µl zu den Wells gegeben. Die Ansätze wurden 2-4 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Inhalt der Wells abgekippt und zwei Mal mit 300 µl PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das PBS abgekippt und die Platte für den BrdU-Test eingesetzt. Um Gewissheit über die Immobilisierung zu

bekommen wurde diese bei der Evaluation des Tests kontrolliert. Zu diesem Zweck wurden die Wells nach dem Waschen mit 3% BSA/PBS blockiert, 2 Mal mit 300 µl PBS gewaschen, 1 h mit anti-mouse-HRP Antikörper inkubiert, 3 Mal mit 300 µl PBS gewaschen und anschließend 10 min mit TMB inkubiert. Eine starke Blaufärbung bestätigte die Immobilisierung der CD3 Antikörper am Plattenboden. Für die Immobilisierung des Kaninchen anti-Maus IgG Antikörpers wurden 10 µg/ml in einem Volumen von 50 µl genutzt und im Weiteren wie bei der CD3 Immobilisierung beschrieben verfahren.

2.2.9 PCR

Die PCR für den CD32a Polymorphismus nach Jiang et al. wurde für die vorliegenden Laborbedingungen modifiziert (Jiang et al. 1996).

2.2.9.1 Isolation und Transkription von RNA

Die RNA eines Non-Responder sowie eines homozygoten Responder wurde nach Angaben des RNeasy® Mini Kit Handbuch (Protokoll: Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology) isoliert und in 40 µl RNase freiem Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die Menge an RNA photometrisch bestimmt und 0,8-1 µg RNA für die Umschreibung in cDNA genutzt. Zu diesem Zweck wurde das QuantiTect® Reverse Transcription Kit genutzt und nach dem gleichnamigen Protokoll verfahren. Von der erhaltenen cDNA wurde 1 µl für die PCR eingesetzt.

2.2.9.2 Reaktionsansätze

CD32a Polymorphismus:

10x buffer BioTherm™	3 µl
dNTP-Mix (10mM each)	0,6 µl
CD32a sense	3 µl
CD32a antisense	3 µl
H ₂ O	19,2 µl
BioTherm™ DNA Polymerase	0,2 µl
DNA	1 µl
Σ	30 µl

CD32a Klonierung:

10x buffer BioTherm™	2,5 µl
dNTP-Mix (10mM each)	0,5 µl
sCD32a XhoI	1 µl
asCD32a EcoRI	1 µl
H ₂ O	18,8 µl
BioTherm™ DNA Polymerase	0,2 µl
DNA	1 µl
Σ	25 µl

2.2.9.3 PCR-Programme

CD32a Polymorphismus: Programm: CD32a

95°C	3'	
95°C	30''	} x40
55°C	30''	
72°C	40''	
72°C	8'	
4°C	∞	

CD32a Klonierung: Programm: CD32cDNA

95°C	3'	
95°C	30''	} x40
60°C	30''	
72°C	1'	
72°C	5'	
4°C	∞	

2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wandern die Proben durch das elektrische Feld eines Agarosegels, das sich in einer ionischen Pufferlösung (TBE) befindet. Die negativ geladene DNA wandert in diesem Feld zum positiven Pol. Dabei ist die Wandergeschwindigkeit der DNA-Probe umgekehrt proportional zur Größe des Moleküls. Um die DNA Probe im Gel sichtbar zu

machen wird das Gel vor dem Gießen mit GelRED™ versehen, welches in die DNA interkaliert und unter UV-Licht orange fluoresziert.

Für das Agarosegel wurde Agarose in TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, nach kurzer Abkühlung mit GelRED™ versehen (1:20.000) und in einen Trägerschlitten gegossen. Für die Auswertung des CD32a Polymorphismus (Responder/Non-Responder) wurden 3%ige Agarosegele, für die Klonierungsarbeiten des CD32a-Gens 1%ige Gele genutzt. Direkt nach dem Gießen wurde das Gel mit einem Kamm versehen, der Taschen für die Proben hinterlässt, und etwa 30 min zum Aushärten ruhen gelassen. Nach dem Pipettieren der mit OrangeG (6x) Ladepuffer versehenen DNA-Proben in die Proben-Taschen, wurde dem Gel eine Spannung von 90 mA (7 cm x 7 cm Gel) bzw. 190 mA (15 cm x 15 cm Gel) für 30-90 min angelegt. Die gelaufenen Gele wurden im Geldokumentationsgerät unter UV-Licht (302 nm) betrachtet.

2.2.11 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme erkennen spezifische, meist palindromische Basensequenzen und schneiden an diesen Sequenzen einen DNA Doppelstrang. Die Schnittstelle für die Restriktionsenzyme wurde durch die Primer in die Sequenz eingebracht. Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme hinterlassen überhängende Enden („sticky ends“).

BstUI/Bsh1236I	CG↓CG GC↑GC
EcoRI	G↓AATT C C TTAA↑G
XhoI	C↓TCGA G G AGCT↑C

Restriktionsansatz Klonierung :

Fast digest Puffer (10x)	3 µl
XhoI	1 µl
EcoRI	1 µl
DNA	bis zu 1 µg
H ₂ O	auf 30 µl
Σ	30 µl

BstU I Restriktionsansatz:

Fast digest Puffer (10x)	3 µl
BstUI	1 µl
DNA	5 µl PCR Ansatz
H ₂ O	auf 30 µl
Σ	30 µl

Bei dem Doppelverdau mit zwei Restriktionsenzymen wurde ein Ansatz von 30 µl gewählt, um den Anteil an Enzymen unter 1/10 des Gesamtvolumens zu halten.

Der Verdau erfolgte für 15 min bei 37°C.

Von dem BstUI Restriktionsansatz wurden 10 µl auf ein 3%iges Agarosegel aufgetragen.

2.2.12 Klonierung

2.2.12.1 DNA-Ligation

Zur Ligation des Vektors mit dem Insert wurden sowohl der Vektor (pcDNA3.1 minus) als auch das jeweilige Insert mit EcoRI und XhoI geschnitten und aufgereinigt. Die jeweilige DNA-Konzentration von Vektor und Insert wurde photometrisch bestimmt und in einem molare Verhältnis von 1:5, der folgenden Formel zugrunde liegend, ligiert:

$$(\text{ng Vektor} \times \text{Kb Insert}) / (\text{Kb Vektor} \times \text{molares Verhältnis Vektor/Insert}) = \text{ng Insert}$$

Die Ligation erfolgte für 15min bei 16°C. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 65°C inkubiert, um die Ligase zu deaktivieren.

Bsp. Ligationsansatz	Vektor	2 µl (50 ng)
	Insert	2,5 µl (47 ng)
	T4-Ligase	1 µl (40 U/µ)
	T4 DNA Ligase Reaction Buffer	2 µl (10x)
	H2O	12,5 µl
	Σ	20 µl

2.2.12.2 Transformation in *E.coli*

Für die Transformation in die chemisch kompetenten DH5α Zellen wurden 10 µl des zuvor beschriebenen Ligationsansatzes verwendet. Die Bakterien wurden im Eisbad aufgetaut und mit 10 µl des Ligationsansatzes vermischt (invertiert, nicht mit der Pipette gemischt) und anschließend für eine halbe Stunde im Eis ruhen gelassen. Anschließend kam der Ansatz für den Hitzeschock 20 Sek in ein 42°C warmes Wasserbad. Nach einer zweiminütigen Abkühlung im Eisbad wurden die Bakterien in 900 µl LB-Medium ohne Antibiotika

aufgenommen und für 1 h bei 125 rpm und 37°C inkubiert. In dieser Erholungsphase beginnen die Bakterien mit integriertem Plasmid die Antibiotikaresistenzproteine der Vektoren zu synthetisieren. Nach der Inkubation wurden 200 µl des Ansatzes auf eine ampicillinhaltige Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.12.3 Plasmidpräparation aus E.coli

Für die Extraktion von Proteinen aus E.coli wurden zwei verschiedene Präparationen verwendet. Die Minipräparation diente der Überprüfung der korrekten Vektor-Insert-Ligation. Das aus der Minipräparation aufgereinigte Plasmid wurde durch Restriktionsverdau auf das Vorhandensein des Inserts geprüft und anschließend zur Sequenzierung geschickt. Die Maxipräparation, aus der mehr DNA gewonnen wird, wurde genutzt, um DNA für die Zelltransfektion zu bekommen.

2.2.12.3.1 Minipräparation

Eine Einzelkolonie der ampicillinhaltigen Agarplatte wurde gepickt, in ein reagenzglasartiges Plastikgefäß mit 4ml LB Medium (mit 0,5 mg/ ml Ampicillin) überführt und über Nacht auf dem Schüttler bei 37°C inkubiert. Aus 3ml Bakterienkultur wurde nach dem Protokoll „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von Qiagen, das Plasmid extrahiert. Das Pellet wurde in 30 µl TE aufgenommen.

2.2.12.3.2 Maxipräparation

Mit 500 µl des überbliebenen Milliliter der Minipräparation wurde eine Maxipräparation in 400-500 ml LB Medium mit Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Präparation wie auch die anschließende DNA Fällung wurden gemäß des Protokolls „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ durchgeführt.

2.2.12.4 Gel-Elution

Für die Isolation einer DNA Bande aus einem Agarosegel wurde die jeweilige Bande über einer UV-Lampe mit einem Skalpell aus dem Gel herausgetrennt. Anschließend wurde die DNA dem Protokoll des „Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System“ (Promega) zufolge aus dem Gel isoliert und aufgereinigt.

2.2.12.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Präparationsprodukte wurde von LGC Genomics (Berlin) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der CD32a Gensequenz abgeglichen und diejenigen Klone ausgesucht, welche keine Mutationen (ausgenommen stille Mutation) aufwiesen.

2.2.12.6 Transfektion in CHO Zellen

Für die Transfektion der ausgewählten Gensequenzen wurden 6 Well Platten mit etwa 80% konfluenten CHO (chinese hamster ovary) Zellen genutzt. Ein bis zwei Mikrogramm DNA wurden in 50 µl DMEM aufgenommen, parallel dazu wurden 5 µl Lipofectamine®2000 in 45 µl DMEM aufgenommen. Beide Ansätze wurden für 5 min bei RT inkubiert, anschließend gemischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zwei Mal mit DMEM gewaschen und anschließend mit dem DNA-Lipofectamine® Gemisch in 500 µl DMEM zu den Zellen gegeben. Nach einer vierstündigen Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurden je Well 2 ml Kultivierungsmedium hinzugefügt. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen abgelöst und in einer 10 cm Petrischale mit Selektionsmedium erneut ausplattiert. Nach etwa einer Woche mit ein- bis zwei-tägigem Mediumwechsel wurden die Zellen auf die Expression des Vektors im Durchflusszytometer getestet.

2.2.12.6.1 Subklonierung der CHO Zellen

Nach der Expressionskontrolle wurden die positiv auf den CD32 Rezeptor getesteten CHO Zellen subkloniert. Zu diesem Zweck wurden 2×10^4 Zellen pro ml Zellsuspension genutzt. In einer 96 Well Platte wurden in jedem Well mit Ausnahme von A1 100 µl Selektionsmedium vorgelegt. In Well A1 wurden 200 µl der Zellsuspension gegeben.

Tabelle 9 Schema Subklonierung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000	500	250	125	63	31	16	8	4	2	1	0
B	500	250	125	63	31	16	8	4	2	1	0	0
C	250	125	63	31	16	8	4	2	1	0	0	0
D	125	63	31	16	8	4	2	1	0	0	0	0
E	63	31	16	8	4	2	1	0	0	0	0	0
F	31	16	8	4	2	1	0	0	0	0	0	0
G	16	8	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0
H	8	4	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Anschließend wurden 100 µl von Well A1 in Well B1 pipettiert und dort durch pipettieren vermischt. Daraufhin wurden 100 µl aus Well B1 genommen und mit den 100 µl Medium aus Well C1 vermischt, so ging es bis Well H. Aus Well H1 wurden schließlich 100 µl Medium verworfen, um das Volumen zwischen den Wells gleich zu halten. Zu den Wells A-H der Reihe 1 wurden dann jeweils 100 µl Selektionsmedium zugefügt und eine 1:2 Verdünnung in Richtung Reihe 12 begonnen. Das bedeutete, dass jeweils nach Durchmischung, 100 µl von Well 1 in Well 2 gegeben wurde, nach erneuter Durchmischung von Well 2 in Well 3 und so fort bis zur Reihe 12. So wurde für die Wells der Zeilen A bis H verfahren. Tabelle 9 zeigt das Pipettierschema mit den theoretisch vorhandenen Zellzahlen pro Well. Nach einer vier- bis fünftägigen Inkubation wurden die Zellklonen mikroskopisch überprüft. Wells mit nur einem Klon wurden für eine erneute Analyse des CD32 Rezeptors gewählt. Nur Zellklone die uneingeschränkt positiv für den transfizierten CD32 Rezeptor waren, wurden expandiert. Zur Sicherung der Klone wurden mehrere Aliquots in Einfriermedium bei -80°C in einer Kryobox heruntergekühlt und nach spätestens zwei Wochen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.13 CHO Transfektanten

Für die PBMC Proliferationsversuche in Anwesenheit der unterschiedlichen CD32a Rezeptoren (R und h) wurden die CHO Transfektanten genutzt. Zu diesem Zweck wurden 20×10^4 der transfizierten Zellen pro Well (96Well Platte) ausgesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um nicht adhärente Zellen zu beseitigen, und schließlich mit PFA fixiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 150 µl/Well 4%igem PFA über 20 min bei RT und wurde daraufhin vier Mal gründlich mit PBS gewaschen. Diese Arbeitsschritte wurden mit sterilen Reagenzien einer Sicherheitswerkbank durchgeführt um eine Kontamination der Platten zu verhindern. Auf den fixierten Zellen wurde der Proliferationsassay wie zuvor beschrieben durchgeführt.

2.2.14 Messung von Zelloberflächenantigenen im Durchflusszytometer

2.2.14.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Ein Durchflusszytometer, ein Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (FACS), ist ein Detektionssystem, das mit Hilfe eines Lasers in der Lage ist, Einzelzellen zu analysieren. Die Zellen werden perlenschnurartig durch Überdruck in einer Kapillare an einem Laser vorbeigeführt. Dabei wird von einem Detektor die Vorwärtsstreuung (Forward Scatter, FSC) gemessen, was der Größe der Zellen entspricht. Ein zweiter Detektor bestimmt die Seitwärtsstreuung (Side Scatter, SSC), was die Granularität der Zellen reflektiert. So können beispielsweise Immunzellen des Blutes unterschieden werden (siehe Abb. 4 A), ohne sie zuvor speziell anzufärben (Autofluoreszenz). Um Zellen mit derselben Größe und Granularität, wie z.B. Lymphozyten-Subpopulationen unterscheiden zu können, nutzt man weitere Detektoren im Gerät, die fluoreszenz-basierte Antikörper-Markierungen messen können. Die gewünschten Zellen wie z.B. T Effektorzellen, müssen zu diesem Zweck vor der Messung mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper versehen werden (Abb. 4 B).

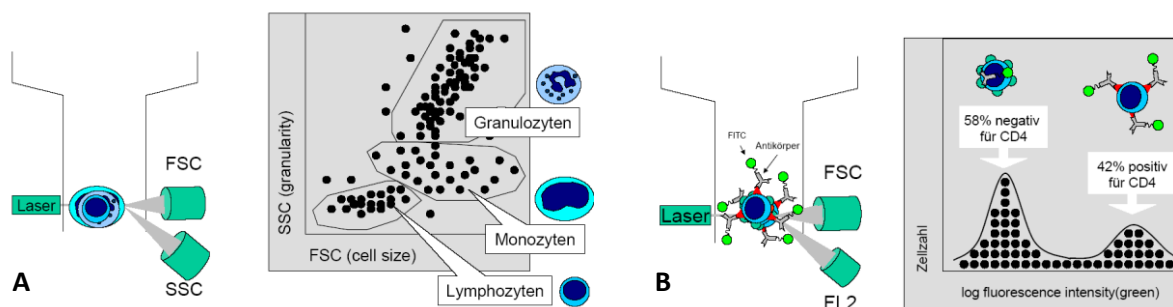


Abbildung 4 Prinzip der Durchflusszytometrie. Das linke Bild ist jeweils eine schematische Darstellung des Messkanals im Durchflusszytometer. A: Aufgetragen ist die Vorwärtsstreuung (Größe der Zellen) gegen die Seitwärtsstreuung (Granularität der Zellen). Eingezeichnet sind die Bereiche der Monozyten, der Granulozyten und der Lymphozyten. B: Aufgetragen ist der Logarithmus der Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl. Der Fluoreszenzfarbstoff FITC emittiert im grünen Bereich bei 517 nm. Das rechte Bild zeigt die Verteilung von fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Zellen am Beispiel der Nutzung eines CD4 Antikörpers (modifiziert nach www.medizin.unigreifswald.de/immun/lehrver/cytometry/cytometry.htm).

Man unterscheidet die direkte- von der indirekten Immunfluoreszenz. Bei der direkten Methode werden spezifische Antikörper verwendet, die an ein Fluorochrom (z.B. FITC, PE) gekoppelt sind. Im Falle der indirekten Immunfluoreszenz ist der Erstantikörper gegen das zu detektierende Molekül gerichtet und es wird ein fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper (Sekundärantikörper) benötigt, der an ein Epitop des Primärantikörpers bindet.

2.2.14.2 Durchflusszytometrische-Messung von PBMC

Die Zellen wurden wie folgt auf eine durchflusszytometrische Messung vorbereitet:

Für die Oberflächenfärbung der Zellen wurden unkonjugierte bzw. FITC, PE, PerCP oder APC gekoppelte Antikörper eingesetzt. Ein Ansatz umfasste 100.000-300.000 Zellen in einem Gesamtvolumen von 50 µl FACS-Puffer. Es wurde immer eine Zellkontrolle ohne Zugabe von Antikörper bzw. nur mit Zweitantikörper angesetzt. Die Verdünnung der Antikörper (1:50, entspricht etwa 10 µg/ml) für die Durchflusszytometrie wurde nach dem Standardprotokoll gewählt. Nur für APC gekoppelte Antikörper wurde eine Verdünnung von 1:10 genutzt. Anschließend wurden die Zellen für 1 h auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze auf 300 µl mit FACS-Puffer aufgefüllt und bei 250 x g für 3 min zentrifugiert. Die Zentrifuge wurde auf 10°C herunter gekühlt, um eine Internalisierung der Antikörper zu verhindern. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und der letzte Tropfen im FACS-Röhrchen mit Zellstoffpapier abgesaugt. Das Zellpellet wurde daraufhin mit 300 µl FACS-Puffer gewaschen. Dazu wurde nach Zugabe des Puffers kurz auf dem Wirbelschüttler gemischt und anschließend erneut zentrifugiert, der Waschschritt wurde zwei Mal wiederholt, das Zellpellet in 200 µl Puffer aufgenommen und direkt gemessen. Für die indirekte Nachweismethode wurde der unkonjugierte Primärantikörper nach der Inkubation mit den Zellen zwei Mal gewaschen und anschließend mit einem anti-Maus-FITC Zweitantikörper inkubiert. Erneut wurde eine Verdünnung von 1:50 in 50 µl gewählt, was in etwa einer Konzentration des Zweitantikörpers von 14 µg/ml entspricht. Nach einer 30 minütigen Inkubation wurden die Zellen zwei Mal gewaschen und in 200 µl Puffer aufgenommen. Abgesehen von den Ansätzen mit PE oder PerCP wurden alle Ansätze mit Propidiumiodid-Puffer versehen. Propidiumiodid (PI) ist ein roter Farbstoff, der in die DNA interkaliert, allerdings gelingt dies nur in apoptotischen Zellen, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist. Daher konnte durch die Gegenwart des PI im Puffer parallel zu den FITC- bzw. APC-Signalen der verschiedenen Zellpopulationen noch der Anteil an toten und lebenden Zellen gemessen werden. PE emittiert im gelb-orangen Wellenlängenbereich und überlappt den roten Bereich, indem die Emissionsspektren von PI und PerCP liegen. Damit sich die Signale von PI und PE oder PerCP nicht überschneiden, wurde die Ansätze mit PE oder PerCP in FACS-Medium ohne PI aufgenommen und auf die Kontrolle der Lebensrate verzichtet. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

2.2.14.3 Mehrfachfärbungen im Durchflusszytometer

Wurden die Zellen mit zwei Farbstoffen markiert, beispielsweise die CD4 bzw. CD8 Markierung der CFSE gefärbten Zellen, so wurde stets versucht Fluorochrome mit nicht überlappenden Emissionsspektren zu kombinieren. Die Emissionsspektren von CFSE/FITC/PE und APC, der in Fluoreszenz 4 emittiert, strahlen nicht ineinander, da sie zeitversetzt von verschiedenen Lasern angeregt werden. PerCP (Fluoreszenz3) hingegen strahlt nur sehr geringfügig in den vierten Kanal und bedarf daher einer geringen Kompensation. Unter Kompensation versteht man eine rechnerische Korrektur, mit der die Streuung der emittierten Fluoreszenz in mehr als einen Kanal minimiert wird.

2.2.14.4 Durchflusszytometrische Messung der CHO Transfektion

Für die Kontrolle des Transfektionserfolges wurden 200.000 CHO Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und für 3 min bei 250 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und der letzte Tropfen im FACS-Röhrchen mit Zellstoffpapier abgesaugt. Das Pellet wurde in 50 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit 10 µg/ml CD32 Antikörper markiert. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und mit anti-Maus-FITC inkubiert, ebenfalls mit einer 1:50 Verdünnung. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation wurden die Zellen erneut zwei Mal gewaschen, in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und anschließend gemessen. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

2.2.14.5 Durchflusszytometrische Messung des Zellzyklus

Um den Zellzyklus zu messen, wurden die Zellen 4h bis 48h nach der Aussaat mit Ethanol fixiert. Dazu wurden 1×10^6 PBMC pelletiert und in 1ml eiskaltem Ethanol (70%) resuspendiert. So können die Zellen über Monate hinweg bei -20°C gelagert werden. Vor der Messung werden die Zellen zwei Mal mit 1ml PBS gewaschen (710 x g, 5 min, 4°C) und anschließend in 1ml PI-Puffer aufgenommen. Nach einer etwa 3 minütigen Inkubation können die Zellen im Durchflusszytometer gemessen werden. Das PI kann in die fixierten Zellen eindringen und dort in die DNA interkalieren. Die Messung des PI Signals einer Zelle gibt Aufschluss über den DNA Gehalt, der sich zur Synthesephase hin verdoppelt und somit die Zellzyklusphase der Zelle bestimmt.

2.2.15 Mikrovesikel

2.2.15.1 Produktion und Isolation

Die Stressinduzierte Produktion von MV wurde durch einen Nährstoffmangel angeregt, indem konfluent gewachsene Zellen für 72 h mit Starvierungsmedium kultiviert wurden. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und für 20 min bei 2860 x g und RT abzentrifugiert um Zellen und größere Zellfragmente zu pelletieren. Um apoptotische Körperchen und Zellorganellen zu eliminieren wurde anschließend ein steriler 0,8 µm Filter genutzt. Der Durchfluss wurde mit 41.000 x g bei 4°C für 1 h ultrazentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die MV im Pellet in 100 µl PBS (4°C) aufgenommen und bei 4°C gelagert. Durch die Weiterentwicklung des Protokolls konnte bei der Isolation der MV von Jurkat Zellen und PBMC auf eine Ultrazentrifugation verzichtet werden. Stattdessen wurden die MV mit Hilfe eines Zentrifugenfilters mit einem Ausschluss von 100 kDa (Centricon®) für jeweils 25 min bei 2860 x g und RT eingeeengt. Durchschnittlich konnten 15 ml Zellüberstand auf 250 µl eingeeengt werden. Da das im Medium als pH Indikator enthaltene Phenolrot bei dieser Filtration die Durchlässigkeit der Filterporen verringerte, wurde Medium ohne Phenolrot genutzt. Jurkat Zellen und PBMC konnten nicht starviert werden, da die Zellen keine 24 h ohne FCS im Nährmedium überleben. Diese Suspensionszellen wurden mit 5×10^6 Zellen in 10 ml (T25 Flasche) PBMC-Vollmedium mit oder ohne 0,5 µg/ml CD3 (UCHT-1, OKT3) für drei bis fünf Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.15.2 Messung

Um die Größe und die Anzahl der aufkonzentrierten MV zu bestimmen, wurden diese im Nanopartikelmessgerät ZetaView® gemessen. Im ZetaView® werden die in der Probe enthaltenen Partikel von einem Laserstrahl angeregt und von einem 90°C Streulicht-Mikroskop erfasst. Über ein Objektiv wird das Licht in die Bildebene einer Kamera projiziert und kann so die Partikel in Echtzeit auf einem Monitor darstellen und per Videoanalyse auszählen. Nach Abzug der Hintergrundstreuung von der Streustärke der Partikel ermöglicht der Kontrast eine Partikelmessung ab einer Konzentration von 10^5 Partikel/ ml mit einer Größe von 10nm -50 µm. Durch Messung der Brownschen Molekularbewegung können Diffusionskonstanten vieler Partikel gemessen werden. Somit kann mit Hilfe der Stokes-Einstein Beziehung die Größe der Partikel berechnet werden. Das Profil für die Größe und die Anzahl der gemessenen Partikel kann an neun Positionen in der Messkammer erstellt werden.

2.2.16 Western Blot

Bei einem Western Blot werden zunächst Proteine aus einer zu untersuchenden Probe mittel einer Gelelektrophoresetechnik (hier Tricingele) der Größe nach aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Auf der Membran können alle (Ponceau) oder einzelne Proteine (mAK) detektiert werden.

2.2.16.1 Lysate

Für die Zelllysate wurden $3-5 \times 10^6$ PBMC in 100 µl für 2 min bis 2 h mit den verschiedenen Stimuli bei RT inkubiert. Die Stimuli (CD3: UCHT-1 oder OKT3, CD3/CD28, CD3/CD28-Beads) wurden mit 125 ng/ml oder 10 µg/ml eingesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen für 30 Sek bei 710 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 50 µl bis 100 µl Lysepuffer aufgenommen. Die Lysate wurden direkt genutzt oder bei -20°C gelagert.

2.2.16.2 Tricingele

Die Tricingele wurden nach dem Schema in Tab. 10 zusammengestellt. Zunächst wurde das Trenngel in die Gießvorrichtung gegossen und mit 1ml Isopropanol überschichtet um eine gerade Abschlusskante zu bekommen. Nach etwa 30 min wurde das Isopropanol abgenommen, das Sammelgel aufgegossen und mit einem Kamm für die Probentaschen versetzt. Nach etwa weiteren 30 min war das Gel polymerisiert.

Tabelle 10 Ansatz für 9%ige Tricingele

Lösung	Trenngel 9%	Sammelgel
30 % Acrylamid + BisAcrylamid (37,5:1)	1,125 ml	0,45 ml
Gelpuffer	1,25 ml	0,775 ml
VE-Wasser	1 ml	1,865 ml
Glycerin	0,375 g	
APS 10% (w/v)	18,75 µl	25 µl
TEMED	1,875 µl	2,5 µl

Die Proben für das Gel wurden mit Lämmli-Puffer (5x) versetzt und 10 min bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben für 1 min bei 13.000 x g zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen, welches zuvor in die dafür vorgesehenen Vorrichtung eingesetzt und vom Kamm befreit wurde. Es wurden jeweils 10-20 µl der Proben in die Geltaschen geladen. Vom Proteinstandard wurden 3 µl eingesetzt und freie Taschen mit 5 µl Lämmli-Puffer beladen, um das Laufverhalten der Gele zu optimieren. Die innere Gelkammer mit der Öffnung für die Proben wurde mit Kathodenpuffer, die äußere Gelkammer mit Anodenpuffer befüllt. Dem Gel wurde für 30 min eine Spannung von 55V angelegt. In dieser Zeit konnten die Proben ins Sammelgel einlaufen und sich an der Grenzschicht zwischen Sammelgel und Trenngel sammeln. Anschließend wurde für weitere 1-3 h eine Spannung von 99V angelegt.

2.2.16.3 Blotten

Zum Blotten wurde das Gel aus der Halterung befreit und das Sammelgel abgetrennt. Die Proteine des Gels wurden für 1h bei 100V auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

2.2.16.4 Detektion

Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceaurot gefärbt, um alle Proteine auf der Membran sichtbar zu machen. Dazu wurde das Ponceaurot 10 Sek durch Schwenken auf dem Blot verteilt und die Färbelösung anschließend zur weiteren Verwendung zurück in die Flasche gegeben. Der Blot wurde mit vollentsalztem Wasser abgewaschen bis sich klare rote Banden auf der Membran erkennen ließen und für die Aufnahme im Fuji LAS3000 Geldokumentationssystem zurechtgeschnitten. Anschließend wurde der Blot zum blocken unspezifischer Bindungen für 1 h in 5% Milchpulver bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Es folgte eine 2-4 h Inkubation mit dem Erstantikörper (Konzentration nach Herstellerangaben) bei RT bzw. über Nacht bei 4°C. Daraufhin wurde der Blot zwei Mal mit PBS gewaschen und schließlich 1 h mit HRP gekoppeltem Zweitantikörper inkubiert. Nach weiteren zwei Waschschritten mit PBS wurde der Blot mit 1 ml frisch angesetzter Chemilumineszenz-Entwicklerlösung versetzt, etwa 1 min inkubiert und anschließend für 1-15 min im Fuji LAS3000 Geldokumentationssystem exponiert. Mit HRP-gekoppelten Direktantikörpern (z.B. Aktin) wurde wie mit dem Zweitantikörper verfahren. Um den Marker auf den Chemilumineszenzbildern sehen zu können, wurde dieser mit einem *in house* hergestellten Phosphoreszenzmarker nachgezogen.

2.2.17 Intrazelluläre Kalziummessung

Der intrazelluläre Kalziumausstoß der PBMC wurde am Fluorospektrometer mit dem Kalziumchelator Fura-2 bestimmt. Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen mit dem unpolaren und daher membrangängigen Acetoxymethyl-Ester von Fura-2 (Fura-2 AM) gefärbt. Durch passive Diffusion in die Zellen eingedrungen, wird AM von Esterasen gespalten und kann die Zelle nicht mehr verlassen. Fura-2 eignet sich zur Kalziummessung, da es durch Bindung von Kalzium sein Anregungsspektrum und somit sein Fluoreszenzverhalten ändert. Die Bindung von anderen Kationen, wie etwa Magnesium, Zink oder Eisen, ist im Vergleich zur Bindung an Ca^{2+} -Ionen zu vernachlässigen (Grynkiewicz et al. 1985). Die Emission von Fura-2 liegt bei 510 nm, die Anregung erfolgt bei 340 nm und 380 nm. Durch die Bindung von Kalzium steigt die Intensität des emittierten Lichtes bei der Anregung mit 340 nm, wohingegen sie mit der Anregung bei 380 nm sinkt. Durch die Bildung des Quotienten der Fluoreszenz bei 340 nm und 380 nm $F_{340/380}$ lässt sich somit eine Änderung des intrazellulären Kalziumspiegels messen. Die Auswertung mit Hilfe des Quotienten hat den Vorteil, dass die Messung unabhängig von der aufgenommenen Menge des Fluoreszenzfarbstoffes, der Wegstrecke des Lichtes durch die Probe sowie der Sensitivität der Messinstrumente ist.

Für die Messung wurden 2×10^6 PBMC in 1 ml PBS mit 5 μM Fura-2 AM gefärbt. Zur besseren Aufnahme des Farbstoffes wurden 3 μl 20%iges Pluronic® F127 zu dem Ansatz gegeben (Maruyama et al. 1989). Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen für 5 min bei 500 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 2ml HS Puffer aufgenommen. Für die Messung im Fluorospektrometer wurde zunächst eine Probe ungefärbter Zellen als Hintergrundmessung definiert, welche von den folgenden Proben automatisch abgezogen wurde. Die Messungen erfolgten immer an Zellen in 2ml HS Puffer, die von zwei Lasern mit 340 nm und 380 nm angeregt wurden. Nach einer Messzeit von einer halben bis zwei Minuten wurde der zu untersuchende Stimulus zu den Zellen gegeben. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen mit 5 μM 4-bromo-A23187, einem halogenisierten Derivat des Ionophors A23187 stimuliert. Dieses ist in der Lage, hochselektiv divalente Kationen durch die Plasmamembran zu transportieren, was zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration führt. Die Stimuli CD3/UCHT-1 und CD3/OKT3 wurden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit Hilfe der Felix Software.

2.2.18 Messung der Zytokine

Der Zellüberstand wurde nach einer 24 stündigen Inkubation der Zellen isoliert. Zu diesem Zweck wurde der Inhalt von 3 Wells (Triplikate) einer 96 Well Platte in ein Eppendorftube überführt und bei $18.620 \times g$ und 4°C für 15 min zentrifugiert. Dadurch wurden die PBMC pelettiert und der Überstand konnte in ein neues Gefäß überführt und bei -80°C eingefroren werden. Die Messung der Zytokine erfolgte durch PD Dr. Bastian Schilling in der Klinik für Dermatologie am Universitätsklinikum Essen. Die Zytokine im Überstand wurden nach Anleitung des FlowCytomix human Th13.plex Kit von eBiosciences im Gallios Durchflusszytometer (Beckmann Coulter) gemessen und anschließend mit der von eBiosciences bereitgestellten FlowCytomix Software analysiert. Als Hintergrundmessung wurden die Werte von unstimulierten Kontrollen genutzt, welche von den Versuchswerten abgezogen wurden.

2.2.19 Schnelltest ELISA

Beim ELISA zur Detektion des Responder/Non-Responder Status wurden 2mg/ml eines NBTII-Lysats am Plattenboden der ELISA-Platten immobilisiert. Dazu wurden 30 μl des Lysats mit 70 μl Lysispuffer pro Well eingesetzt. Nach einer zweistündigen Inkubation bei RT wurde die Platte 3 Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 350 μl 3%igem BSA/PBS pro Well blockiert. Die Blockierung erfolgte für 1h bei RT oder bei 4°C ü.N. Die BSA Proteine sättigen die freien Bindungsstellen der Kulturplatte ab und verhindern so, dass es zur unspezifischen Bindung der folgenden Antikörper kommt. Das im Zelllysate enthaltene endogene CEACAM1-Protein der NBTII Zellen wurde im nächsten Schritt mit dem monoklonalem Ratte-anti-Maus Antikörper Be9.2 detektiert. Dazu wurde dieser in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ in 1,5% BSA/PBS mit je 100 μl /Well für 1h auf die Platte gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen/Well (in 100 μl 1,5% BSA/PBS) bzw. 100 μl Heparin-Vollblut/Well für 1h auf der Platte inkubiert. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Waschschritte behutsamer ausgeführt, da die Bindung der Monozyten FcR an den Be9.2 Antikörper nur gering affin ist. D.h. 300 μl PBS wurden langsam mit der Pipette am Rand des Wells zugegeben und nach kurzem Schwenken der Platte mit der Pipette wieder abgezogen, auf das Abklopfen der Platte wurde fortwährend verzichtet. Nach drei Waschschritten wurde den Wells 100 μl einer 5 $\mu\text{g/ml}$ Lösung Maus-anti-Human CD14-Biotin hinzugefügt. Im Anschluss an eine 1stündige Inkubation wurde erneut drei Mal

behutsam gewaschen und schließlich 1h mit Streptavidin-HRP detektiert. Die Bindung der Streptavidin/Biotin-Komplexe wurde nach drei weiteren vorsichtigen Waschschritten nach Zugabe von 100 µl TMB/Well durch den Substratumsatz mittels HRP sichtbar gemacht. Die Reaktion wurde auf dem Schüttler inkubiert und die Blaufärbung auf der Platte wurde stetig kontrolliert. Nach dem Erreichen eines kräftigen Blautons, nach etwa 5-20 min, wurde die Reaktion mit 100 µl 0,2M Schwefelsäure abgestoppt und umgehend im ELISA-Reader bei einer OD_{450nm} gemessen. Als Referenz-Wellenlänge wurde OD_{620nm} gewählt.

2.2.20 Statistische Auswertung

Um zu ermitteln bei welcher Stichprobengröße der Unterschied des Anteils weiblicher Responder zwischen gesunden Spendern und Melanompatienten als signifikant anzusehen ist, wurde mit der Software R ein „proportion test“ durchgeführt. Für den Unterschied von 44% bei gesunden Spendern zu 76% bei Melanompatienten und einer Teststärke (engl. power) von 85% ergab sich dabei ein notwendiger Stichprobenumfang von 50 Personen pro Gruppe.

3 Ergebnisse

In vorangegangenen Arbeiten (Dreesen 2011, Dreesen 2012) zur vorliegenden Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass eine Proliferation von PBMC durch die Zugabe von löslichem CD3 mAk in Abwesenheit eines Ko-Stimulus, wie beispielsweise α CD28, möglich ist und nicht, wie in der Literatur beschrieben, zur Anergie der Zellen führt. Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit näher charakterisiert. Dazu wurde in der vorangegangenen Masterarbeit sowie in der vorliegenden Doktorarbeit mit den CD3 mAks der Hybridome UCHT-1 und OKT3 gearbeitet. Bei beiden Antikörpern handelt es sich um monoklonale Antikörper von verschiedenen Hybridomen aus dem Wirt Maus, die an humanes CD3 ϵ binden. Im Gegensatz zu einer CD3/OKT3 mAk Stimulation, die stets zur T Zell Proliferation führte, konnte eine CD3/UCHT-1 mAk Stimulation nur bei den Zellen von etwa 40% der Probanden eine Proliferation auslösen. Daher wurden die Probanden bezüglich des Ansprechens ihrer PBMC auf CD3/UCHT-1 in Responder und Non-Responder unterteilt. Um die Wirkung der CD3 mAk zu testen, wurden in der vorliegenden Arbeit Proliferation (CFSE- oder BrdU Assays), Aktivierungsmarker (Dreesen 2011), PBMC-Morphologie (FCS/SSC) sowie die Zytokinausschüttung der zu untersuchenden PBMC getestet.

3.1 Welche Subpopulation der PBMC reagiert auf eine CD3 mAk Stimulation?

Die *in vitro* Experimente wurden stets mit PBMC und nicht mit isolierten T Zellen durchgeführt. Da T Zellen bei Immunantworten prinzipiell nicht isoliert von anderen Leukozyten-Subtypen agieren, sollten so möglichst physiologische Bedingungen simuliert werden. Aufgrund der Tatsache, dass sich PBMC aus mehreren Zelltypen zusammensetzen, wurde zunächst analysiert, ob der Erwartung entsprechend, lediglich T Zellen durch den CD3 Stimulus zur Proliferation angeregt werden. Um dies zu bestätigen, wurden CFSE beladene Zellen nach vier bis fünf Tagen mit Antikörpern für die verschiedenen Subpopulationen: Monozyten (CD14), B Zellen (CD19), NK Zellen (CD16, CD56), T Zellen (CD4, CD8) markiert und im Durchflusszytometer gemessen. Dabei zeigte sich, dass ausschließlich T Zellen proliferieren (vgl. Abb. 5). B Zellen, NK Zellen sowie Monozyten proliferierten nicht durch eine Stimulation mit CD3 mAk (Daten nicht gezeigt). Dieses und die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse gelten sowohl für eine CD3/UCHT-1 mAk- als auch für eine CD3/OKT3 mAk induzierte Stimulation der Zellen. Die PBMC, der in dieser Arbeit

untersuchten Probanden, entsprachen in ihrer Zusammensetzung durchschnittlich den in der Literatur beschriebenen Werten (siehe Einleitung 1.3). Allerdings gab es teils starke Schwankungen zwischen verschiedenen Probanden. So schwankte beispielsweise der Anteil an Monozyten zwischen 5% und 35%. Der Anteil an T Zellen zeigte hingegen kaum Schwankungen und lag konstant bei 50-70% (Daten nicht gezeigt). Dabei lag der Anteil CD4 positiver T Zellen (T Helferzellen, T_H) bei 36-55% und der Anteil $CD8^+$ T Zellen (zytotoxische T Zellen, T_{cyt}) bei 13-35%. Das Verhältnis von $CD4^+$ zu $CD8^+$ Zellen ist ein wichtiges Erkennungsmaß für verschiedene Erkrankungen (Virusinfekte Autoimmunerkrankungen) (Gratama et al. 1986). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Probanden lag das CD4/CD8 Verhältnis am Tag der Isolation (d0) je nach Proband zwischen 1,1 und 1,8 (vgl. Tab. 11) und entsprach somit dem in der Literatur beschriebenen Normalbereich (Amadori et al. 1995).

Zusammengenommen zeigte sich, dass die Parameter der verwendeten PBMC aller getesteten Probanden den Normwerten entsprachen und ein CD3 mAk Stimulus ausschließlich zur Proliferation von T Zellen führt

Tabelle 11 Das Verhältnis von $CD4^+$ zu $CD8^+$ T Zellen verändert sich durch die Kultivierungsbedingungen und einen CD3 Stimulus. Je ein repräsentative Spender pro Geschlecht (Responder n=6).

CD4/CD8 Verhältnis	Tag 0	nicht stimuliert	CD3 stimuliert
Responder ♂	36/31 -> 1,16	Tag 3 50/31 -> 1,61 <u>PI positiv:</u> CD4: 17% CD8: 40% Tag 6 53/25 ->2,12	Tag 3 50/37 -> 1,35 <u>PI positiv:</u> CD4: 26% CD8: 35% Tag 6 42/41 -> 1,02
Responder ♀	42/35 -> 1,20	Tag 3 47/29 -> 1,62 <u>PI positiv:</u> CD4: 16% CD8: 27% Tag 6 49/24 ->2,04	Tag 3 48/43 -> 1,12 <u>PI positiv:</u> CD4: 11% CD8: 12% Tag 6 43/51 -> 0,84

Wie in Tabelle 11 am Beispiel zweier repräsentativer Spender zu erkennen ist, steigert sich das CD4/CD8 Verhältnis innerhalb der PBMC durch Kultivierung der Zellen zugunsten der $CD4^+$ T Zellen (Tag0 ♂1,16/♀1,2 zu Tag3 nicht stimuliert ♂1,61/♀1,62). Nach einer dreitägigen Inkubation ohne Stimulus steigt der Mengenanteil CD4 positiver Zellen von ♂36%/♀42% auf ♂50%/♀47%, wohingegen der Anteil CD8 positiver Zellen gleichbleibend bis sinkend ist ♂31%/♀35% zu ♂31%/♀29%. Dieser Trend verstärkt sich noch leicht, wenn

die Zellen für sechs Tage inkubiert werden (CD4: ♂36%/♀42% auf ♂53%/♀49%, CD8: ♂31%/♀35% zu ♂25%/♀24%). Durch Färbung der Zellen mit PI an Tag 3 wird deutlich, dass bei einer Kultivierung der Zellen ohne Stimulation etwa 17% CD4⁺ T Zellen, vermehrt jedoch CD8⁺ T Zellen sterben (♂40%, ♀27%). Wurden die Zellen allerdings mit einem CD3 mAk Stimulus aktiviert, ist der Anteil PI positiver CD4⁺ und CD8⁺ T Lymphozyten vergleichbar (♂: 26%/35% ♀: 11%/12%). Die prozentualen Anteile beider T Zell Subtypen innerhalb der PBMC steigern sich durch die CD3 mAk induzierte Proliferation. Dabei zeigt sich diese Steigerung stärker für den CD8 Subtyp. Die verstärkte CD8⁺ Zell-Proliferation zeigt sich als Tendenz an Tag 3 (♂: 31% zu 37% ♀: 35% zu 43%), wird jedoch deutlich erkennbar an Tag 6 (♂: 31% zu 41% ♀: 35% zu 51%). Der prozentuale Anteil CD4 positiver Zellen sinkt hingegen von Tag 3 zu Tag 6 wieder (♂: 50% zu 42% ♀: 48% zu 43%). Für einen Teil der Probanden war das Verhältnis von CD3 mAk stimulierten Zellen nach drei Tagen im Vergleich zum Verhältnis am Tag der Isolation annähernd gleich oder sogar leicht reduziert (vgl. Abb. 11 ♂). Vergleicht man allerdings an Tag 3 das Verhältnis von nicht stimulierten und CD3 mAk stimulierten Zellen, kam es in allen Fällen zu einer deutlichen Senkung des CD4/CD8 Verhältnisses für die stimulierten Zellen (Tag 3 nicht stimuliert ♂1,61/♀1,62 zu Tag 3 stimuliert ♂1,35/♀1,12). Bei einer sechstägigen Kultivierung der CD3 mAk stimulierten Zellen, zeigte sich hingegen bereits im Vergleich zu Tag 0 eine Reduktion des CD4/CD8 Verhältnisses (Tag 0 ♂1,16/♀1,2 zu Tag 6 stimuliert ♂1,02/♀0,84). Die in Tabelle 11 dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die CD3 Stimulation mit UCHT-1, weshalb an dieser Stelle nur Responder dargestellt sind. Für eine Stimulation mit CD3/OKT3 zeigten sich vergleichbare Ergebnisse, auch für Non-Responder. Da diese Daten nur einmal reproduziert wurden, sind sie nicht dargestellt.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass CD3 mAk zur Proliferation von CD4⁺ und insbesondere CD8⁺ T Lymphozyten führen. Zudem zeigte sich, dass CD8⁺ T Zellen im Gegensatz zu CD4⁺ T Zellen bei einer Kultivierung der Zellen vermehrt sterben.

Wie genau die Proliferation der T Zell Subtypen aussieht, konnte mit Hilfe von CFSE markierten Zellen nach einer viertägigen Kultivierung verlässlich abgebildet werden (Abb. 5).

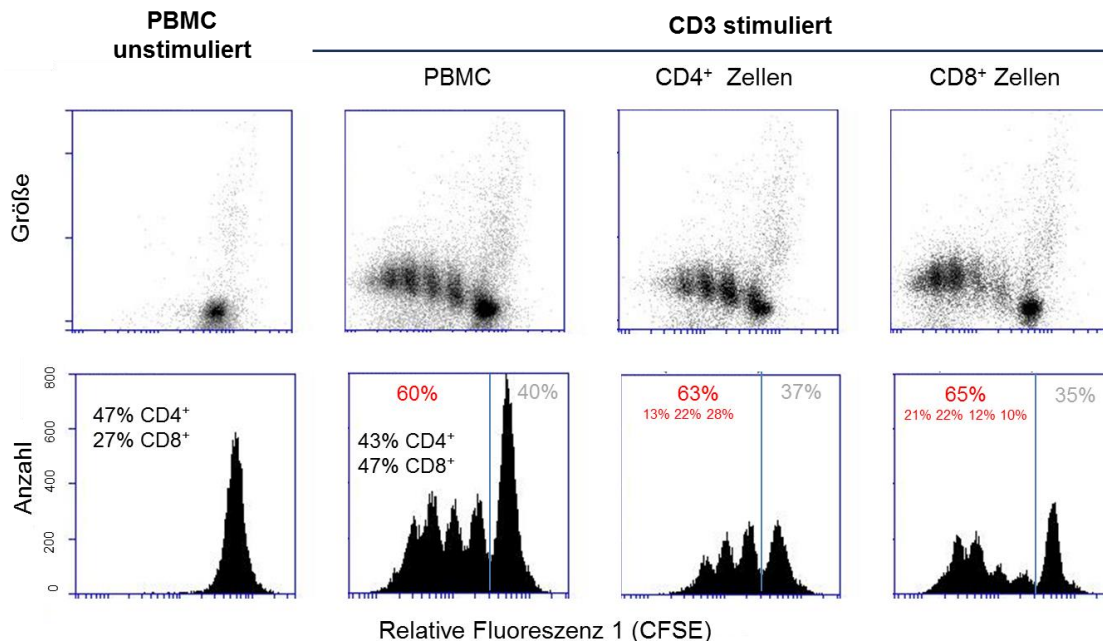


Abbildung 5 CD8 positive T Zellen proliferieren häufiger als CD4 positive T Zellen. Frisch isolierte und anschließend CFSE gefärbte PBMC wurden für vier Tage in An- oder Abwesenheit von CD3/OKT3 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit CD4-APC und CD8-APC gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Gezeigt ist die CFSE Fluoreszenzintensität gegen die Größe der Zellen in einem Punktdiagramm (obere Bildreihe) und gegen die Zellzahl in einem Histogramm (unterer Bildreihe). Jede Zellpopulation links der naiven Zellen entspricht einer Zellteilung. Insgesamt zeigen sich vier Zellteilungen für 60% der Zellen, dabei teilten sich die CD4⁺ T Zellen maximal drei Mal, mit absteigender Häufigkeit. Die CD8⁺ T Zellen hingegen proliferierten bis zu vier Mal mit zunehmender Intensivität. Auch der Anteil CD8⁺ Zellen in der Population stieg durch die Proliferation, wohingegen der Anteil CD4⁺ Zellen relativ konstant blieb.

Nach einer viertägigen Inkubation mit CD3 Antikörpern (UCHT-1 oder OKT3) zeigten PBMC bis zu vier Zellteilungen im CFSE Profil. Abb. 5 zeigt, dass sich durch die Stimulation mit CD3/OKT3 in einem Zeitraum von vier Tagen etwa 60% der Zellen des in Abb. 5 gezeigten Probanden ein bis vier Mal teilen. Darunter sind nur T Zellen die, wie zuvor beschrieben, als einziger PBMC Subtyp mit Proliferation auf einen CD3 mAk Stimulus reagieren. Eine Kultivierung ohne CD3 mAk Stimulus zeigte nur eine Messspitze und somit keine Zellteilungen während der viertägigen Kultivierung. Innerhalb dieser nicht stimulierten Zellen befanden sich 74% T Lymphozyten, darunter 47% CD4 positive und 27% CD8 positive T Zellen. Stimuliert man die PBMC mit CD3 mAk, proliferieren die T Zellen und teilen sich wie in Abb. 5 gezeigt bis zu vier Mal. Etwa 15% der Zellen teilten sich einmal, 15% zweimal, weitere 15% drei und wieder 15% vier Mal. Der Anteil an T Lymphozyten lag nach vier Tagen bei 90%, davon waren 43% CD4- und 47% CD8 positiv. Innerhalb beider Subpopulationen teilten sich jeweils 16% der Zellen nicht. Daher waren etwa 32% der nicht

geteilten Zellen T Zellen. Schaut man sich das CFSE Profil getrennt für die einzelnen T Zell Subpopulationen an, erkennt man einen deutlichen Unterschied. Die $CD4^+$ Zellen teilten sich während der viertägigen Inkubation nur drei Mal (Abb. 5 dritte Spalte), wohingegen die $CD8^+$ Zellen vier Zellteilungen zeigten (Abb. 5 vierte Spalte). Weiterhin sank der Anteil sich teilender $CD4^+$ Zellen mit jeder Zellteilung. Während annähernd die Hälfte aller proliferierenden $CD4^+$ T Zellen (28%), sich nur einmal teilten, waren es bei zwei Zellteilungen 22% und bei drei Zellteilungen nur noch 13% der Zellen. Bei den $CD8^+$ T Zellen hingegen, hatte der Großteil der proliferierenden Zellen drei bis vier Zellteilungen vollzogen. 21% der Zellen zeigten vier Zellteilungen und 22% der Zellen drei Zellteilungen, aber nur 12% bzw. 10% der Zellen waren in der Messspitze für zwei, respektive eine Zellteilung zu finden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine CD3 Stimulation von PBMC zu einem Anstieg der $CD4^+$ T Zellen und in höherem Maße der $CD8^+$ T Zellen innerhalb der PBMC führt. Dieses Ergebnis ist sowohl vom Geschlecht als auch vom Responder/Non-Responder Status unabhängig.

Zu welchem Zeitpunkt nach der CD3 mAk Zugabe die Zellen mit der Proliferation beginnen, wurde durch Zellzyklus-Analysen mit PI untersucht.

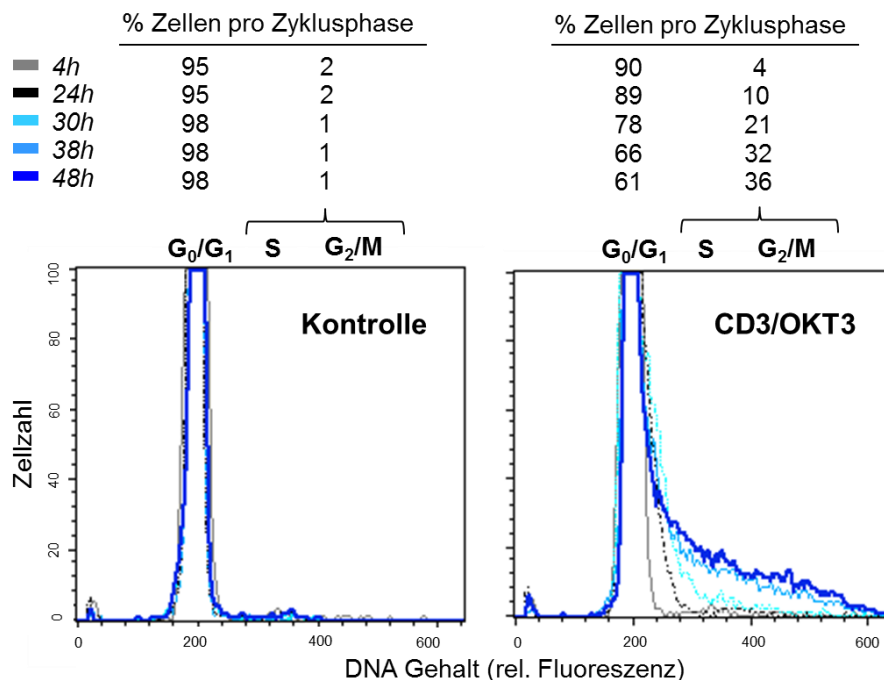


Abbildung 6 Die CD3 mAk induzierte Proliferation von T Zellen beginnt 30 h nach der Stimulation. Frisch isolierte PBMC wurden mit oder ohne CD3/OKT3 Stimulation für 4 h bis 48 h kultiviert, anschließend mit Ethanol fixiert und mit PI im Durchflusszytometer gemessen. Die Histogramme zeigen den DNA Gehalt in Abhängigkeit zur Zellzahl. G0: ruhende Zellen, G1: Zellwachstum, S: Synthese der DNA, G2: Vorbereitung zur Zellteilung, M: Zellteilung. Die DNA Synthese begann bereits nach 24 h. Zwischen 30 h und 36 h nach der Stimulation setzte die Mitose der Zellen und somit das Ende der Zellteilung ein. Das Ergebnis wurde einmal reproduziert.

Abbildung 6 zeigt den DNA Gehalt von nicht stimulierten sowie CD3/OKT3 stimulierten Zellen zu den Zeitpunkten 4 h, 24 h, 30 h, 38 h, 48 h. In der Kontrolle waren über den gemessenen Zeitraum 95% - 98% der Zellen in der G₀/G₁ Phase. Diese Zellen teilten sich nicht. Bei einer CD3 mAk Stimulation war bis zu 16 h nach der Stimulation kein Eintritt der DNA in die Synthesephase zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 6 zu sehen, treten 24 h nach der CD3 mAk Stimulation bereits 10% der Zellen in die Synthesephase ein. Nach 30 h hatte sich dieser Anteil bereits verdoppelt und nach 38 h waren über 30% der Zellen in der Synthese oder bereits in der Zellteilungsphase. Der DNA Gehalt CD3 mAk stimulierter Zellen nach 48 h war mit der Messung nach 38 h vergleichbar. Das bedeutet, eine durch CD3 mAk induzierte T Zell Proliferation beginnt zwischen 30 h und 36 h nach Zugabe des Stimulus.

Dieses Ergebnis deckt sich mit den in der vorangestellten Masterarbeit dargestellten Experimenten, bei denen gezeigt wurde, dass 24 h nach einer CD3 mAk Stimulation von PBMC noch keine BrdU Proliferation nachweisbar ist (Dreesen 2012).

3.1.1 Was sind die optimalen Parameter für eine CD3 mAk induzierte T Zell Stimulation?

Durch funktionelle Vergleiche (Dosis-Wirkungs-Kurve, Variation von Zellzahl und Inkubationsvolumen) der beiden verwendeten CD3 mAk konnte gezeigt werden, dass bereits eine sehr geringe Antikörperkonzentration für die Induktion einer T Zell Proliferation ausreicht.

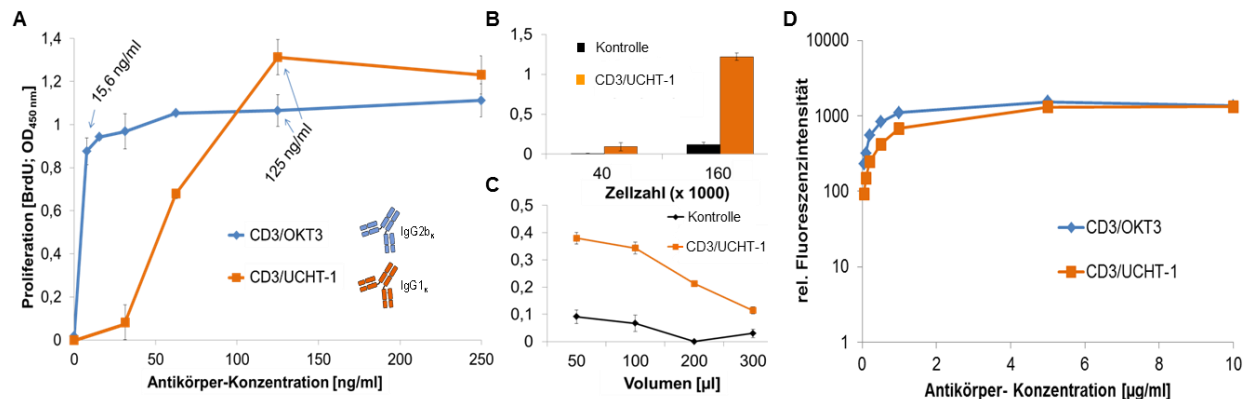


Abbildung 7 CD3/UCHT-1 und CD3/OKT3 zeigen abhängig von der Zellzahl und dem Inkubationsvolumen bereits bei sehr geringen Konzentrationen einen proliferativen Effekt. A) Die Dosis-Wirkungskurve zeigt den im BrdU Assay gemessenen proliferativen Effekt der CD3 mAk für Konzentrationen von 0 bis 250 ng/ml. Beide CD3 Klone zeigen einen maximalen, funktionellen Effekt bei 125 ng/ml. CD3/OKT3 stimulierte Zellen zeigen bereits bei einer Konzentration von 15 ng/ml eine Proliferation, diese steigert sich leicht bis 50 ng/ml und erreicht dann ihr Plateau. Für CD3/UCHT-1 hingegen konnte erst bei 50 ng/ml eine Proliferation detektiert werden, die bis 125 ng/ml noch deutlich zunahm und dort ihr Plateau erreichte. Repräsentativer Spender (n=4) B) Messung der BrdU Proliferation für verschiedene Zellzahlen. Durch den Einsatz von 125 ng/ml CD3/UCHT-1 mAk wurde mit 40.000 Zellen pro Well anders als mit 160.000 Zellen pro Well keine Proliferation detektiert. Repräsentativer Spender (n=6) C) Messung der BrdU Proliferation mit 40.000 Zellen pro Well in diversen Inkubationsvolumina. Mit 125 ng/ml CD3/UCHT-1 wurde bei dem an dieser Stelle gezeigten Spender in einem Inkubationsvolumen von 100 µl eine Proliferation detektiert, welche bei Senkung des Volumens verstärkt wurde. Bei einer Erhöhung des Inkubationsvolumens wurde die Proliferation dagegen abgeschwächt/eliminiert. Repräsentativer Spender (n=3) D) Messung der relativen Fluoreszenzintensität verschiedener Konzentrationen Fluoreszenzmarkierter CD3 mAk. Die Bindungskapazität von CD3/UCHT-1 ist etwas geringer verglichen mit CD3/OKT3. Die maximale Bindungskapazität lag für beide Antikörper bei etwa 5 µg/ml des jeweiligen mAk. Repräsentativer Spender (n=2).

Abbildung 7 A verdeutlicht, mit welcher geringer Menge CD3 mAk bereits eine Proliferation in PBMC eines Responder ausgelöst werden kann. In Abb.7 ist repräsentativ die Auswertung eines Probanden gezeigt. Für die Stimulation mit CD3/OKT3 zeigte sich bereits mit weniger als 10 ng/ml eine deutliche Induktion der T Zell Proliferation, die auch mit einer Erhöhung der Antikörper-Konzentration nicht weiter gesteigert werden konnte. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei Non-Respondern gemessen. Für CD3/UCHT-1 zeigte sich bei einigen Probanden ebenfalls eine Proliferation bereits ab etwa 10 ng/ml, allerdings gab es auch Spender deren Zellen erst mit 50 ng/ml des Antikörpers zu einer Proliferation angeregt

wurden (siehe Abb. 7A). Um die gleiche Menge beider Hybridomklone einzusetzen und dabei verlässlich eine Proliferation zu erhalten, wurden für die funktionellen Versuche als aktive Konzentration stets 125 ng/ml des jeweiligen CD3 mAk genutzt. Bei dieser Konzentration beginnt die Dosis-Wirkungskurve für beide Antikörper in ein Plateau überzugehen und die Proliferation der Zellen kann auch mit Konzentrationen bis zu 10 µg/ml CD3 mAk nicht weiter gesteigert werden (Daten nicht gezeigt). Abbildung 7 D verdeutlicht, dass die maximale Bindungsaffinität der CD3 mAk erst bei einer Konzentration von etwa 5 µg/ml erreicht wird. Die Bindungskurve zeigte Messwerte der CD3 mAk Bindung von 0,05 µg/ml bis 10 µg/ml. Für den Bereich von 0,05 µg/ml bis 1 µg/ml war eine geringere Steigung und somit eine leicht erniedrigte Bindungsaffinität für CD3/UCHT-1 im Vergleich zu CD3/OKT3 erkennbar.

Zu Beginn der Arbeiten mit CD3 mAk wurde bei den Proliferationsassays entsprechend der Herstellerangaben (Roche, Cell Proliferation ELISA, BrdU) mit einer Zellzahl von 40.000 Zellen pro Well und einem Volumen von 100 µl pro Well einer 96 Well Platte gearbeitet. Mit einer ausreichenden bis überschüssigen CD3 mAk Stimulation konnten bei dieser Zellzahl allerdings nur die Zellen von wenigen Probanden (< 30%) zur Proliferation angeregt werden. Bei einer Erhöhung der Zellzahl auf 100.000 – 200.000 Zellen pro Well, bei gleichbleibendem Volumen, konnte hingegen eindeutig eine Proliferation der Zellen ausgelöst werden (vgl. Abb. 7 B). Daher wurde eine Zellzahl von 160.000 Zellen pro Well als Standard für die weiteren Proliferationsversuche verwendet.

Die oft nicht erfolgreichen Proliferationsversuche mit 40.000 Zellen pro Well können nicht auf Unzulänglichkeiten des Messverfahrens zurückgeführt werden, da die Zellen einiger Probanden auch mit dieser Zellzahl reproduzierbar durch CD3 mAk zur Proliferation angeregt werden konnten. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Bindung des CD3 mAk nicht zu einer sofortigen Proliferation der Zellen führt, sondern die Synthese und Sezernierung von Zytokinen bewirkt, welche ihrerseits eine Proliferation der Zellen auslösen. Bei einer geringen Zellzahl könnte somit die Menge an Zytokinen unzureichend für eine Proliferationsinduktion sein, da sie im Inkubationsvolumen zu sehr verdünnt werden. Um diese Hypothese zu festigen wurde untersucht, welchen Einfluss eine Änderung des Inkubationsvolumens auf die Proliferation der Zellen hat. In Abbildung 7 C ist das Ergebnis des BrdU Assays eines Spenders zu sehen, der mit 40.000 Zellen pro Well und dem gängigen Inkubationsvolumen von 100 µl eine geringe Proliferation zeigt. Wird das Inkubationsvolumen erhöht, ist kaum noch eine Proliferation messbar. Wird das Volumen hingegen verringert, findet man eine erhöhte Proliferation der Zellen. Diese Ergebnisse

unterstützen die vorangestellte Hypothese. So könnte eine für die Proliferation erforderliche kritische Konzentration an Zytokinen durch mehr Zellen oder ein geringeres Inkubationsvolumen erreicht werden.

Da IL-2 der am besten beschriebene T Zell Wachstumsfaktor ist, wurde zunächst mit anti IL-2 Antikörpern getestet, ob die potentiell durch IL-2 ausgelöste Proliferation blockiert werden kann. Durch das Abfangen von löslichem IL-2 mit Hilfe eines α IL-2 Antikörpers in verschiedenen Konzentrationen, zeigte sich jedoch keinerlei Beeinträchtigung der Proliferationsergebnisse (Daten nicht gezeigt).

3.2 Kommt es durch einen CD3 Stimulus von PBMC zu einem Ausstoß von Zytokinen?

Zur weiteren Überprüfung der Zytokin-Hypothese wurde der Überstand CD3 stimulierter Zellen nach 24 h mit dem Multiplex Cytokine Array (eBiosciences, San Diego, CA) analysiert.

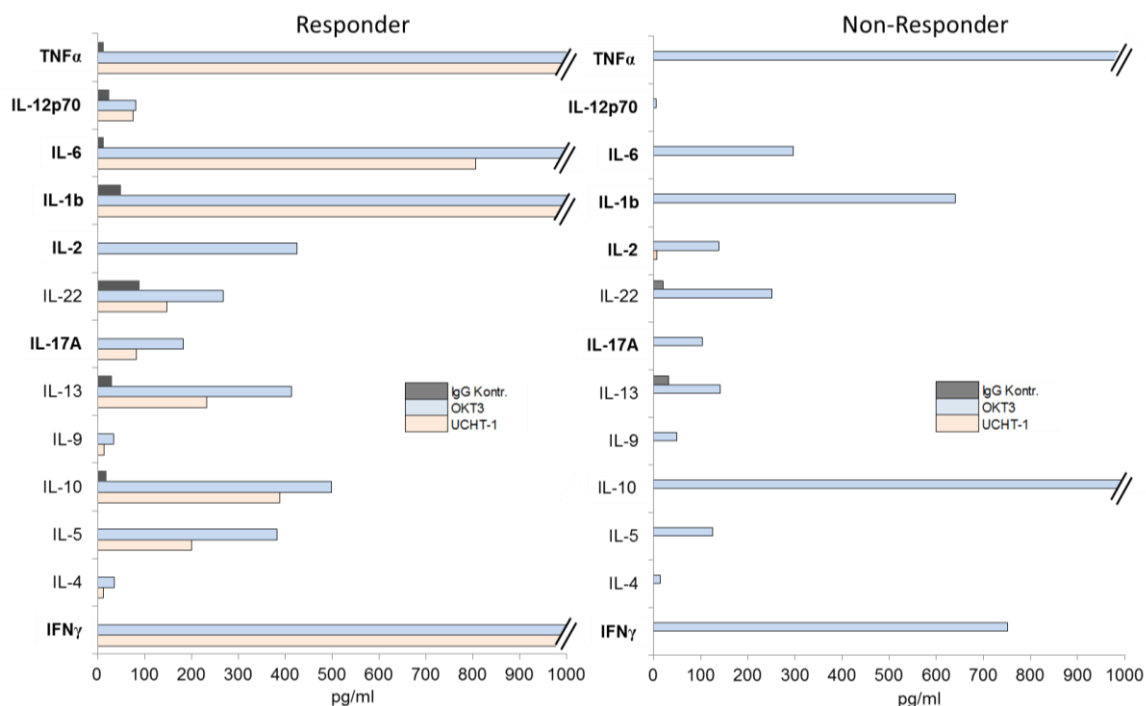


Abbildung 8 Ein CD3 Stimulus führt zur Ausschüttung einer Vielzahl von Zytokinen. Gezeigt ist die Menge (pg/ml) von 13 Zytokinen, welche nach 24 h im Überstand CD3 stimulierter Zellen gemessen wurden. Proinflammatorische Zytokine sind in schwarz hervorgehoben. In der Abbildung sind repräsentativ ein Responder (links) und ein Non-Responder (rechts) von jeweils drei unabhängigen Messungen gezeigt. Die blauen Balken zeigen die Ergebnisse für eine CD3 Stimulation mit OKT3 und die beigen Balken für die CD3/UCHT-1 Stimulation. In grau ist die IgG Kontrolle dargestellt. Die schwarzen Querstriche am Ende eines Balken zeigen an, dass die Werte über die angezeigte Skala von 1000 pg/ml hinausgehen. CD3/UCHT-1 Stimulation Responder: TNF α 8252 pg/ml, IL-1 β 1366 pg/ml, IFN γ 1135 pg/ml; CD3/OKT3 Stimulation Responder: TNF α 12256 pg/ml, IL-6 1863 pg/ml, IL-1 β 3454 pg/ml, IFN γ 3048 pg/ml; Non-Responder: TNF α 7678 pg/ml, IL-10 1500 pg/ml, IFN γ 1244 pg/ml.

Dafür wurden jeweils vier unabhängige Responder und Non-Responder untersucht. In Abb. 8 ist jeweils ein repräsentativer Proband pro Gruppe gezeigt. Bei dem in Abb.8 dargestellten Responder sind für die IgG Kontrolle etwa 80 pg/ml IL-22 nachweisbar. Die Messungen aller anderen Zytokine liegen hingegen deutlich unter 40 pg/ml und damit nicht mehr im sensitiven Messbereich des T_H13plex Zytokinarrays. Für eine Stimulation mit CD3/OKT3 war die Ausschüttung von 8 der 13 Zytokine mit über 250 pg/ml deutlich messbar. 250 pg/ml wurden hier frei gewählt um eine Einordnung der Zytokine zu ermöglichen. Dabei lagen vier der Zytokine sogar weit über 1000 pg/ml, IL-6 mit 1863 pg/ml, IFN γ und IL-1 β mit etwa 3000 bzw. 3500 pg/ml und TNF α mit über 12.000 pg/ml. Bei einer Stimulation mit CD3/UCHT-1 fiel die Zytokinausschüttung der Zellen deutlich geringer aus. Hierbei wurden lediglich fünf der 13 untersuchten Zytokine mit mehr als 250 pg/ml ausgeschüttet. Darunter in abnehmender Reihenfolge TNF α > IL-1 β > IFN γ > IL-6 > IL-10. Mit Ausnahme von IL-6 konnten diese Zytokine übereinstimmend für die CD3 mAk Stimulation aller getesteten Responder ermittelt werden. IL-6 zeigte bei der Hälfte der untersuchten Probanden eine starke Sekretion und bei der anderen Hälfte lediglich eine geringe Sekretion um 100 pg/ml. Während IL-5 und IL-22 nur für den in Abb.8 gezeigten Probanden gemessen wurden, konnte eine IL-2 Sekretion durch eine CD3/OKT3 mAk Stimulation für alle Responder gezeigt werden. Für die Stimulation mit CD3/UCHT-1 mAk hingegen, konnte bei zwei der Probanden keine IL-2 Sekretion und bei den anderen Zwei nur eine Sekretion unter 50 pg/ml detektiert werden. Bei Non-Respondern wurden in der IgG Kontrolle sowie durch eine CD3/UCHT-1 mAk Stimulation keine signifikanten Mengen an Zytokinen sekretiert. Lediglich bei den Zytokinen IL-2 und IL-13 zeigte sich in der IgG Kontrolle eine geringe Messung von unter 30 pg/ml. Für eine Stimulation mit CD3/OKT3 mAk war der Zytokinausstoß zwischen Respondern und Non-Respondern vergleichbar. In dem gezeigten Beispiel sowie für die drei anderen getesteten Non-Responder, kam es zu einer Ausschüttung von mehr als 250 pg/ml TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-10 und IFN γ . Wie bei den Respondern wurde auch bei den Non-Respondern am meisten TNF α ausgeschüttet. Während bei den Respondern die Menge an sekretiertem IFN γ und IL-1 β größer war als die des IL-10, ist es bei Non-Respondern umgekehrt. Allgemein scheinen diese Zytokine bei Respondern in höheren Konzentrationen ausgeschüttet zu werden (vgl. Abb. 8).

Die Zytokinmessungen bekräftigen die zuvor aufgestellte Hypothese, dass eine CD3 mAk Stimulation von PBMC zur Ausschüttung von Zytokinen führt und gibt zusätzlich einen Überblick welche Zytokine an der darauf folgenden T Zell Proliferation beteiligt sein könnten.

3.3 Welche Signalkaskade wird durch anti-CD3 mAk ausgelöst?

Zunächst sollte untersucht werden, ob eine Behandlung von PBMC mit CD3 mAk zu einer Signaltransduktion über den TZR führt, die mit der physiologisch auftretenden Bindung von MHC präsentierten Antigenen vergleichbar ist. Dazu wurde die Aktivierung von Zap-70, Lck und LAT anhand von Tyrosin-Phosphorylierung (T-Phosphorylierung) im Western Blot untersucht. Alle drei Proteine sind als initiale Signalproteine des TZR Signalwegs beschrieben und werden im Zuge einer physiologischen T Zell Stimulation Tyrosin-phosphoryliert (T-phosphoryliert) und dadurch aktiviert (August, Dupont 1994). In den Lysaten von PBMC, die zwei bis 30 min mit CD3 mAk (UCHT-1, OKT3) stimuliert wurden, können Zap-70 und LAT Proteine allerdings nur in ihrer nicht T-phosphorylierten, also nicht aktivierten Form detektiert werden. Lck wird dagegen über die gesamte Zeitspanne und auch in der Negativkontrolle als T-phosphoryliert vorgefunden (vgl. Abb. 9 A, 10 A). Aufgrund dieser unerwarteten Ergebnisse wurden weitere Signalmoleküle der TZR Signalkaskade analysiert.

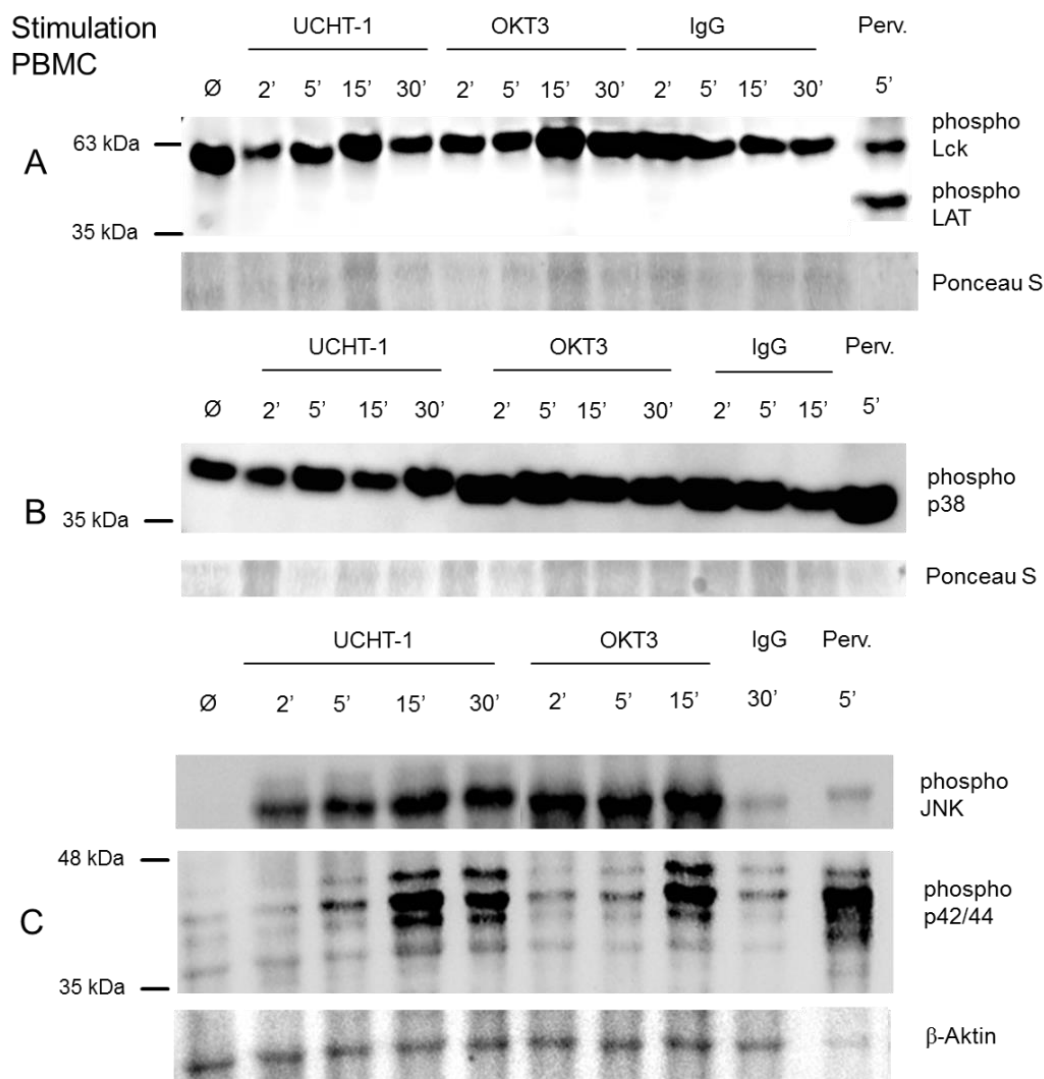


Abbildung 9 Proteine der TZR Signalkaskade, werden nicht durch die Bindung von CD3 mAk aktiviert. 5×10^6 PBMC wurden für zwei bis 30 min mit CD3 mAk oder einer Isotypkontrolle (IgG, Be9.2) stimuliert, in 100 µl Lysepuffer aufgenommen und mit je 10 µl pro Spur aufgetragen. Als Negativkontrolle diente zusätzlich ein Lysat von unbehandelten Zellen (Ø) und als Positivkontrolle eine fünfminütige Behandlung der Zellen mit Pervanadat (Perv.). A) Detektion der Lck- und LAT T-Phosphorylierung im Western Blot sowie ein Ausschnitt der Ponceaus S Färbung des Proteinblots. Während Lck konstitutiv phosphoryliert erschien, war eine LAT T-Phosphorylierung nicht nachweisbar (n=3) B) Detektion der p38 T-Phosphorylierung im Western Blot sowie ein Ausschnitt der Ponceaus S Färbung des Proteinblots. Das Signalmolekül p38 lag konstitutiv phosphoryliert vor (n=3) C) Detektion der JNK- und p42/44 T-Phosphorylierung im Western Blot sowie eine β-Aktin Färbung. JNK lag bereits nach einer zwei minütigen CD3 mAk Stimulation der Zellen phosphoryliert vor. Diese T-Phosphorylierung verstärkte sich leicht in den 30-minütigen Verläufen der Stimulation. Die Moleküle p42/p44 zeigten sich nach einer 15-minütigen CD3 mAk Stimulation im T-phosphorylierten Zustand (n=3).

Die Untersuchung weiterer Signalmoleküle, die später bei der TZR Signalkaskade phosphoryliert werden, ergab, dass p38 wie Lck konstitutiv phosphoryliert vorliegt. Für JNK zeigte sich eine T-Phosphorylierung bereits nach einer zweiminütigen Stimulation und ist gleichbleibend bis leicht verstärkt für längere CD3 mAk Stimulationen. Erk2/1 hingegen lag erst 15 min nach einer CD3 mAk Stimulation im T-phosphorylierten Zustand vor. Diese Ergebnisse sind dabei für CD3/UCHT-1 und CD3/OKT3 vergleichbar.

Da in der T Zell Forschung oftmals mit Jurkat Zellen, einer immortalen T Zelllinie an Stelle von frisch isolierten T Zellen gearbeitet wird, wurde an dieser Stelle ebenfalls der CD3 mAk Einfluss auf die T-Phosphorylierung von Zap-70 in Jurkat Zellen untersucht.

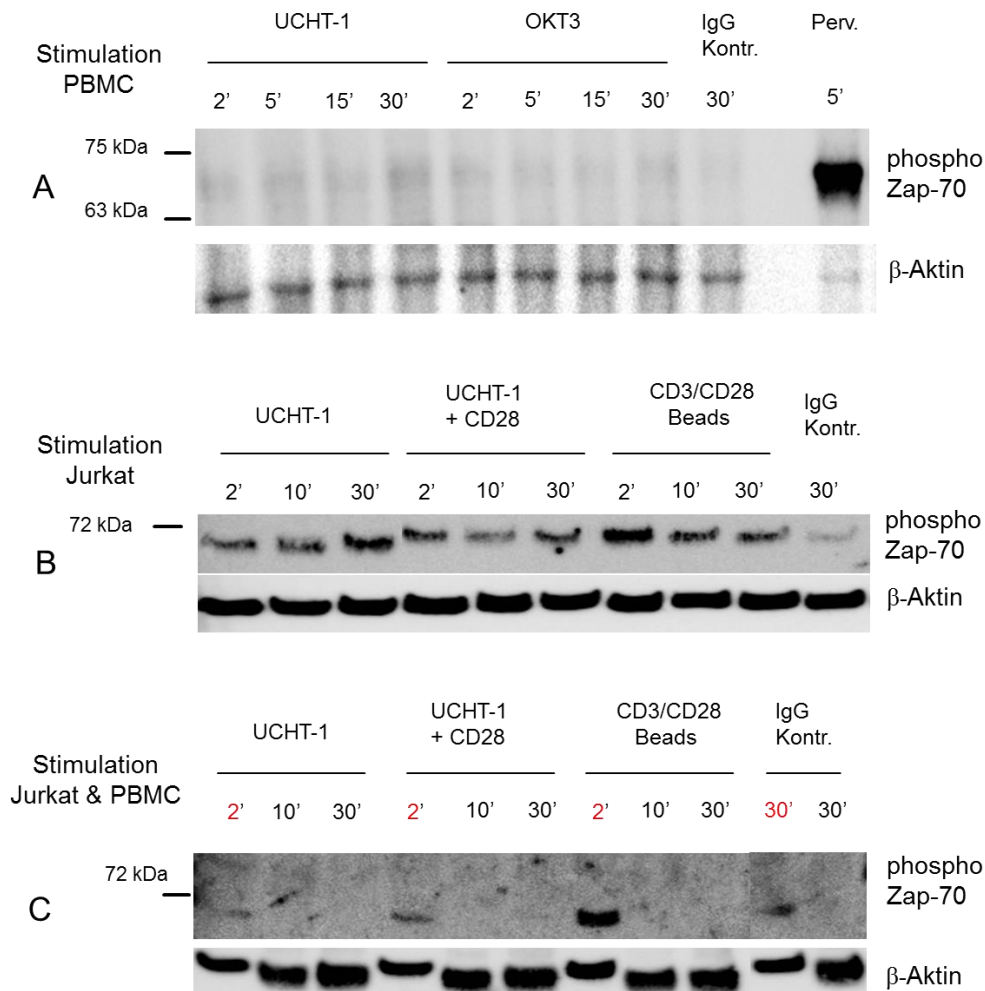


Abbildung 10 Zap-70 wird in Jurkat Zellen, nicht aber in PBMC nach einer Stimulation mit CD3 mAk inkubiert. 5×10^6 PBMC oder Jurkat Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte und mit den angegebenen Antikörpern stimuliert, in 100 μ l Lysepuffer aufgenommen und je 10 μ l pro Spur aufgetragen. Die Blots zeigen die Analyse des T-phosphorylierten Zap-70 Proteins. Die Detektion des β -Aktin diene als Ladekontrolle. Als Isotypkontrolle (IgG) diene Be9.2. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen mit Pervanadat (Perv.) behandelt. A) Detektion der Zap-70 T-Phosphorylierung in CD3 mAk stimulierten PBMC eines gesunden Spenders. B) Detektion der Zap-70 T-Phosphorylierung in CD3 mAk stimulierten Jurkat Zellen. C) Detektion der Zap-70 T-Phosphorylierung in CD3 mAk stimulierten PBMC sowie Jurkat Zellen auf einem Blot. Aufgrund der in A gezeigten Ergebnisse sind für PBMC keine Werte für 2 min angegeben. Für 2 min bis 30 min CD3 mAk stimulierte PBMC lässt sich keine Zap-70 T-Phosphorylierung nachweisen. In Jurkat Zellen beginnt eine Zap-70 T-Phosphorylierung hingegen bereits nach zwei min.

Abbildung 10 verdeutlicht, dass Jurkat Zellen anders als PBMC, mit einer Zap-70 T-Phosphorylierung auf die verschiedenen CD3 mAk Stimuli reagieren. In Abbildung 10 A ist die Detektion der Zap-70 T-Phosphorylierung für eine CD3 mAk Stimulation von PBMC zu sehen. Beide CD3 mAk (UCHT-1, OKT3) lösten nach Zugabe innerhalb von 30 min keine

T-Phosphorylierung des Zap-70 Proteins aus. Lediglich in den mit Pervanadat behandelten Zellen, wodurch es zu einer generellen T-Phosphorylierung kommt, war eine Proteinbande nachweisbar. Abbildung 10 B zeigt eine CD3/UCHT-1 Stimulation mit und ohne Ko-Stimulus sowie eine Stimulation mit CD3/CD28 Beads für Jurkat Zellen. Der Ko-Stimulus wurde an dieser Stelle ebenfalls analysiert, da eine Stimulation mit CD3/CD28 als Positivkontrolle gewählt wurde (Kim, White 2006). Abgesehen von der Negativkontrolle (IgG) war in jedem Ansatz T-phosphoryliertes Zap-70 Protein nachweisbar. Dabei stieg die nachweisbare Menge des phosphorylierten Proteins für eine Stimulation mit CD3/UCHT-1 mAk proportional zur Stimulationszeit von 30 min. Für eine CD3/UCHT-1/CD28 Stimulation nahm die T-phospho-Zap-70 Menge nach einer zehn minütigen Stimulation leicht ab, wohingegen sie nach einer 30 minütigen Stimulation wieder verstärkt auftrat. Dies konnte jedoch nicht in allen Versuchen beobachtet werden. Für eine Stimulation mit CD3/CD28 Beads war die größte Menge an T-phosphoryliertem Protein nach einer zweiminütigen Stimulation zu sehen. Diese nahm mit einer Verlängerung der Stimulation wieder ab. In Abbildung 10 C ist die Zap-70 T-Phosphorylierung für eine zweiminütige CD3 mAk Stimulation von Jurkat Zellen sowie eine 10- und 30-minütige Stimulation von PBMC dargestellt. Der Vergleich zeigt erneut, dass lediglich bei den Jurkat Zellen eine Zap-70 T-Phosphorylierung nachweisbar ist. Die größte Phospho-Zap-70 Proteinmenge zeigte sich dabei für eine Stimulation mit CD3/CD28 Beads. Die Homogenität der geladenen Proteinmenge zwischen den verschiedenen Ansätzen ist durch β -Aktin Messungen angezeigt.

Tabelle 12 TZR Signalmoleküle (n=3-5, X= nicht nachweisbar)

2-120 min CD3 Stimulation	UCHT-1	OKT3
phospho CD3ζ-Kette	x	x
phospho Zap-70 Y319	x	x
Phospho Zap-70 Y493	x	x
phospho Lck	konstitutiv (auch in neg. Kontrolle)	konstitutiv (auch in neg. Kontrolle)
phospho LAT	x	x
phospho JNK	ab 2 min	ab 2 min
phospho p38	konstitutiv (auch in neg. Kontrolle)	konstitutiv (auch in neg. Kontrolle)
phospho p42/44 Erk2/1	ab 15 min	ab 15 min

Tabelle 12 fasst alle in dieser Arbeit an PBMC untersuchten Signalmoleküle zusammen. Bei einer intrazellulären Messung im Durchflusszytometer wurde die T-Phosphorylierung der ζ -Kette des CD3 Rezeptors untersucht. Auch hierfür konnte keine T-Phosphorylierung durch eine CD3 mAk Stimulation ausgelöst werden. Für die Untersuchung der Zap-70 T-Phosphorylierung wurde neben dem zuvor gezeigten Zap-70 Antikörper der Firma Cell Signaling, der eine T-Phosphorylierung am Tyrosinrest 319 erkennt (Bindungsstelle für Lck), noch ein weiterer Antikörper der Firma Millipore genutzt. Dieser erkennt eine T-Phosphorylierung von Zap-70 am Tyrosinrest 493, welcher in der katalytischen Domäne liegt und somit wichtig für die Kinaseaktivität des Proteins ist. Die Blots entsprachen der Detektion des LAT und zeigten keine Zap-70 Aktivierung für eine Stimulation mit CD3 mAk (vgl. Abb. 9A, Abb. 10).

Um Hinweise zu bekommen, durch welche Signaltransduktion CD3 mAk eine T Zell Proliferation auslösen, führte Herr Oliver Halfman im Rahmen einer von mir betreuten Bachelorarbeit weitere Untersuchungen zur CD3 mAk induzierten T Zell Stimulation durch. Da es bei einer T Zell Aktivierung über den TZR zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentration des für die Proliferationsinduktion notwendigen Botenstoffes Kalzium kommt, untersuchte Herr Halfmann zunächst den intrazellulären Kalziumausstoß während einer Stimulation mit CD3 mAk.

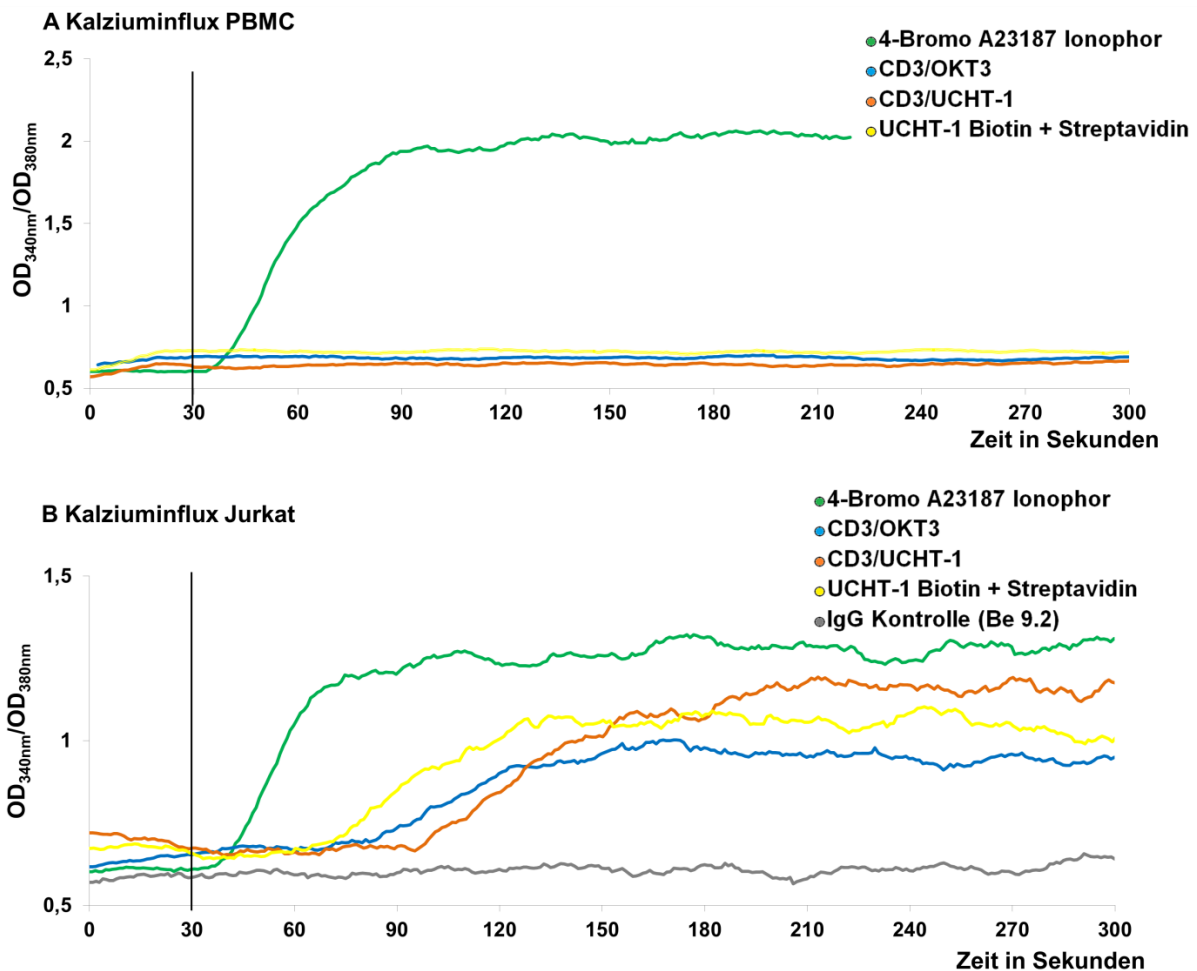


Abbildung 11 Die Bindung von CD3 Antikörpern löst einen intrazellulären Kalziumanstieg in Jurkat Zellen, nicht aber in PBMC aus. 2×10^6 Zellen wurden mit Fura-2 gefärbt und der intrazelluläre Kalziumgehalt im Fluoreszenzspektrometer bei 340 nm und 380 nm gemessen. Aufgetragen ist eine Trendlinie des Verhältnisses der Messungen von 340 nm zu 380 nm im Verlauf von 300 Sek. Der schwarze Längsbalken bei 30 Sek zeigt den Zeitpunkt der Zugabe der verschiedenen Stimuli an. In grün ist die Messung vor und nach Zugabe des 4-Bromo A23187 Kalziumionophors zu sehen, der als Positivkontrolle genutzt wurde. Die blaue Linie zeigt die spektroskopische Messung vor und nach CD3/OKT3 mAk Zugabe, die orange Linie zeigt dasselbe für CD3/UCHT-1. Die gelbe Linie steht für Zellen die vor der Messung für 15 min mit biotinyliertem CD3 mAk inkubiert wurden und durch Zugabe von Streptavidin stimuliert werden sollten. In PBMC konnte lediglich mit dem Kalziumionophor ein Anstieg der intrazellulären Kalziummenge provoziert werden, wohingegen sich in Jurkat Zellen auch durch eine CD3 Stimulation eine Kalziumfreisetzung nachweisen ließ (PBMC: Responder n=4, Non-Responder n=2, Jurkat n=2).

Abbildung 11 A veranschaulicht eine Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration für PBMC, die mit Fura-2 AM gefärbt wurden. Durch eine Stimulation der Zellen mit dem Kalziumionophor A23187 konnte ein Kalziumeinstrom in die Zellen provoziert werden. Eine Stimulation der Zellen mit CD3 mAk (UCHT-1, OKT3) hingegen, führte über einen Messzeitraum von 5 min nicht zu einer Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Ein Teil der Zellen wurde vor der Messung 15 min mit biotinyliertem CD3 mAk (CD3-Biotin) inkubiert. Diesen Zellen wurde Streptavidin zugegeben, welches die CD3 mAk und somit die daran gebundenen TZR quervernetzen sollte. Auch diese Variante

fürte über die gesamte Messdauer nicht zu einer Ausschüttung von Kalzium in den Zellen. Eine CD3 mAk Stimulation von Jurkat Zellen auf der anderen Seite, führte schon nach wenigen Sekunden zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Eine Behandlung der Jurkat Zellen mit dem Kalziumionophor war zeitlich mit den in PBMC Zellen beobachteten Kalziumanstieg vergleichbar. Die Intensität des Kalziumanstiegs war zwischen den Messungen recht unterschiedlich. Unabhängig von der Intensität jedoch, zeigte die Stimulation der Zellen mit dem Ionophor die aktuelle, maximale Kalziummessung in den Zellen an. Für eine CD3/OKT3 mAk Stimulation begann der Anstieg des freien Kalziums bereits 50 Sek nach Zugabe des Stimulus, wohingegen es bei CD3/UCHT-1 etwa 20 Sek länger dauerte. Dagegen zeigte sich durch eine CD3/OKT3 Stimulation ein Kalziumanstieg in den Zellen, der etwa der Hälfte der Maximalmenge entspricht, wogegen eine CD3/UCHT-1 Stimulation nach etwa zweieinhalb Minuten zu einer fast maximalen Kalziumkonzentration in den Zellen führte. Für beide Stimulationen lag der Kalziumgehalt in den Zellen etwa 15 min nach Zugabe des Stimulus wieder bei den Basalwerten (Daten nicht gezeigt). Daher zeigten auch die CD3-Biotin vorbehandelten Zellen zu Beginn der Messung basale Werte. Eine Quervernetzung durch Streptavidin führte bereits 30 Sek nach dessen Zugabe zu einem Kalziumanstieg. Im weiteren Verlauf ist der Kalziumausstoß mit den Werten der direkten CD3 mAk Stimulation vergleichbar. Dies zeigt zum einen, dass die Methode der TZR-CD3-Biotin-Streptavidin Quervernetzung funktioniert. Da ein CD3 mAk Stimulus bereits zum Kalziumausstoß führt und CD3-Biotin mAk vor-stimulierte Zellen durch Streptavidin Zugabe erneut zum intrazellulären Kalziumanstieg führt, lässt sich zum anderen daraus schließen, dass ein Kalziumausstoß mehrfach in den Zellen ausgelöst werden kann. Insgesamt machen diese Messungen deutlich, dass eine CD3 Stimulation in Jurkat Zellen, nicht aber in primären T Zellen, zu einer Signaltransduktion führte, die einen Kalziumanstieg in den Zellen induzierte.

Um Anhaltspunkte zu erhalten welche Signalmoleküle tatsächlich an der durch CD3 mAk induzierten T Zell Proliferation beteiligt sind, wurde des Weiteren mit Inhibitoren einiger prominenter Signalmoleküle gearbeitet. Herr Halfmann konnte zeigen, dass die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie der Kinasen JNK, PI3K und AKT einen Einfluss auf die Mitogenität der in der vorliegenden Arbeit untersuchten CD3 mAk haben.

Tabelle 13 Inhibitoren wichtiger Signalmoleküle. MW, n=3

Signalprotein	Gebrauchskonzentration (in μM)	Reduktion der Proliferation in %		
		U	O	IL-2
NF-κB Bay 11-7082	3,5	66	61	X
JNK SP 600125	10	58	25	49
PI3K LY 294002	5	85	92	92
AKT MK 2206	5	85	90	75
p38 SB 203580	10	0	0	0

In Tabelle 13 ist die Auswertung der Daten aus besagter Bachelorarbeit zusammengefasst. Die Inhibition der Signalmoleküle PI3K sowie AKT, die in Signalwegen eng miteinander verbunden sind, führte sowohl bei einer Stimulation mit CD3/UCHT-1 mAk als auch mit CD3/OKT3 mAk zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Proliferation von T Lymphozyten. Auch eine IL-2 induzierte T Zell Proliferation konnte durch Inhibition dieser Signalmoleküle um drei Viertel verringert werden. Eine Inhibition des Transkriptionsfaktors NF κ B sorgte bei der Stimulation beider CD3 mAk für eine Verringerung der Proliferation um zwei Drittel des ursprünglichen Wertes. Daten zur IL-2 Stimulation wurden bis dato nicht erhoben. Die Inhibition der Kinase JNK, welche den Transkriptionsfaktor c-Jun aktiviert, zeigte für eine CD3/UCHT-1 Stimulation ähnliche Ergebnisse wie die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF κ B. Die Proliferationsminderung einer CD3/OKT3 mAk Stimulation hingegen betrug nur 25%. Eine IL-2 induzierte T Zellproliferation konnte mit dem JNK Inhibitor um die Hälfte gesenkt werden. Die Inhibition der MAP Kinase p38 zeigte keinerlei Auswirkung auf die Proliferation der getesteten CD3 mAk T Zell Stimuli. Eine Induktion der Apoptose durch das DMSO in dem die Inhibitoren gelöst waren, wurde im Vorfeld der Untersuchungen durch Dosis-Wirkungskurven mit DMSO Konzentrationen bis zu 0,5% ausgeschlossen. Ob die Inhibitoren an sich apoptotisch auf die Zellen wirken wurde mit PI Messungen analysiert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass es durch zwei weitere NF κ B Inhibitoren (Bay-7085, Honokiol) zu einer Proliferationsinhibition durch ein Absterben der Zellen kam (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Kinasen JNK, PI3K und AKT sowie der Transkriptionsfaktor NF κ B maßgeblich an der durch CD3 mAk induzierten T Zell Proliferation beteiligt sind.

3.4 Ist der Responder/Non-Responder Status in Krebspatienten verändert?

In der dieser Doktorarbeit vorangegangenen Masterarbeit konnte gezeigt werden, dass die Antikörper des CD3 Hybridomklons UCHT-1 nur bei 41% der gesunden Probanden-PBMC zu einer Proliferation der Zellen führten. Weiterhin zeigte sich ein Geschlechtsdimorphismus mit 60% Respondern in der männlichen Population und nur 24% in der weiblichen Population. Untersuchungen an Proben leukämischer Patienten ergaben einen Anteil von 63% Respondern. Dabei war der Anteil der männlichen Population mit 56% analog zur Kontrollgruppe, wohingegen der Anteil weiblicher Responder unter den Leukämie-Patientinnen mit 71% deutlich erhöht war (Dreesen 2012). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass der Responder/Non-Responder Status bei Frauen einen Einfluss auf das Risiko hat, Leukämien oder möglicherweise andere maligne Erkrankungen zu bekommen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher neben den Leukämiepatienten noch eine Gruppe von Melanompatienten mit in die Untersuchungen aufgenommen. Zudem wurde die Anzahl der Probanden und Patienten im Vergleich zur vorangegangenen Masterarbeit von 32 auf bis zu 100 Personen erhöht. Die Zellen der untersuchten Kontrollprobanden stammten zumeist von Mitarbeitern des Universitätsklinikums Essen und zum Teil von anonymen Blutspendern. Die Zellen der Leukämiepatienten stammten aus Proben, die von PD Dr. Michael Koldehoff zur Verfügung gestellt wurden. Die Proben der Melanompatienten wurden von PD Dr. Bastian Schilling bereitgestellt. Die Altersverteilung zwischen gesunden Probanden und Patienten war vergleichbar (siehe 2.2.2).

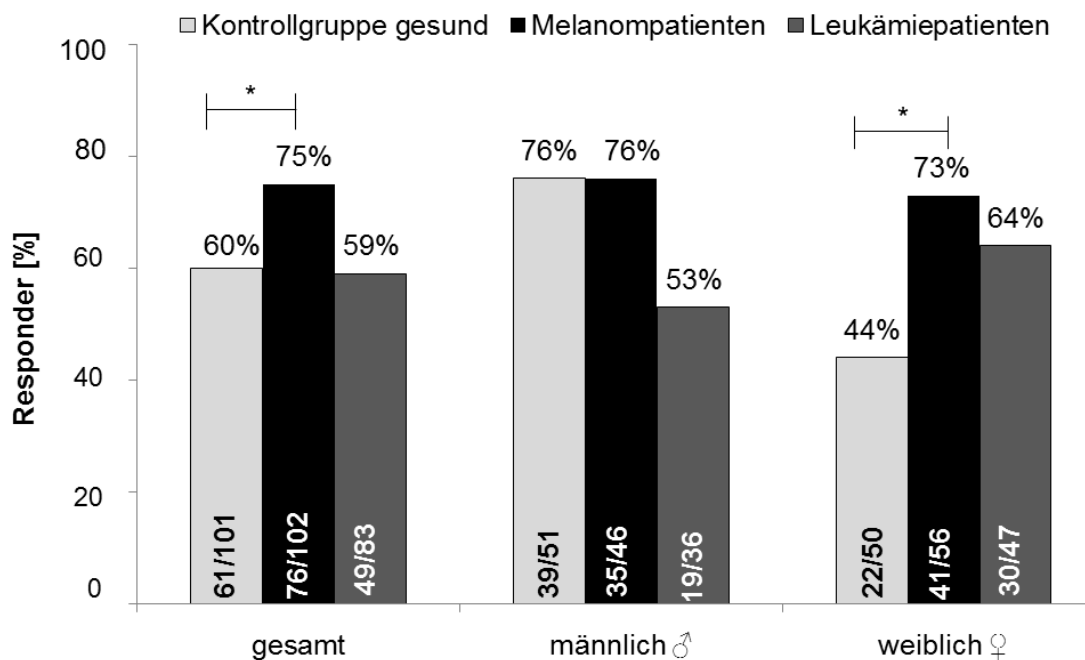


Abbildung 12 Für den CD3/UCHT-1 mAk zeigen sich Non-Responder mit einer unterschiedlichen Verteilung bezüglich Geschlecht und Gesundheitsstatus. Frisch isolierte PBMC von Patienten und Probanden wurden mit $1,6 \times 10^5$ Zellen/Well und 125 ng/ μ l CD3/UCHT-1 in 100 μ l Vollmedium kultiviert und nach drei Tagen auf Proliferation hin untersucht. Dargestellt ist die Anzahl der Responder allgemein und aufgeteilt nach Geschlecht. Unter den weiblichen Kontrollprobanden waren deutlich weniger Responder verglichen mit der männlichen Population. Vergleicht man gesunde Probanden mit Melanompatienten und Leukämiepatienten zeigt sich eine deutliche Erhöhung an Respondern in der weiblichen Population. Fisher's exact test * $p < 0,05$.

Abbildung 12 veranschaulicht, dass aus der Kontrollgruppe von 101 gesunden Blut-Spendern lediglich die T Zellen von 60% mit einer Proliferation auf eine CD3/UCHT-1 Behandlung reagieren. Aufgeteilt nach Geschlecht bemerkt man, dass 76% der männlichen Spender Responder sind, wohingegen es in der weiblichen Population nur 44% Responder gibt. Schaut man sich die Responder bei den Melanompatienten an wird deutlich, dass 76 von 102 getesteten Patienten auf CD3/UCHT-1 reagieren können. Damit lag der Gesamtanteil an Respondern mit 75% deutlich höher, verglichen mit den gesunden Spendern. Teilt man die Responder unter den Melanompatienten anhand ihres Geschlechts, zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung mit 76% männlichen Respondern und 73% weiblichen Respondern. Der Vergleich mit den gesunden Kontrollen zeigte eine gleichartige Verteilung für die männlichen Spender. Für die weiblichen Spender hingegen enthüllt sich eine deutliche Differenz zwischen 44% weiblichen Respondern in der Kontrollpopulation und 73% bei den Melanompatienten. Die Anzahl untersuchter Leukämiepatienten konnte in dieser Studie von 32 auf 83 Patienten erhöht werden. Dabei lag die Gesamtheit der Responder bei 59% und war somit nahezu identisch mit dem Wert der Kontrollgruppe. Der Anteil männlicher Responder lag bei den Leukämie-Patienten mit 53% allerdings niedriger als in der Kontrollgruppe. Im

Gegensatz dazu war der Anteil bei den weiblichen Patienten verglichen mit gesunden Probanden um 20 Prozentpunkte erhöht.

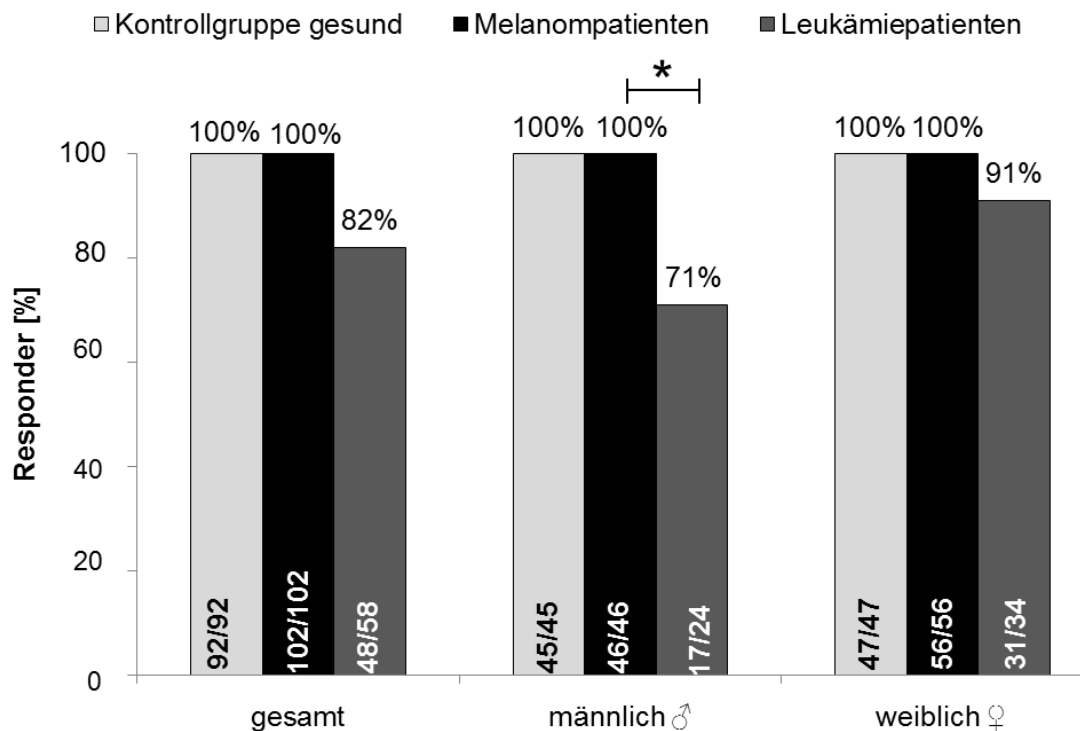


Abbildung 13 Ein Teil der Leukämiepatienten kann auch auf den CD3/OKT3 mAk nicht reagieren. Frisch isolierte PBMC von Patienten und Probanden wurden mit $1,6 \times 10^5$ Zellen/Well mit 125 ng/μl CD3/OKT3 in 100 μl Vollmedium kultiviert und nach drei Tagen auf Proliferation hin untersucht. Dargestellt ist die Anzahl der Responder allgemein und aufgeteilt nach Geschlecht. Am unteren Ende der Balken sind die absoluten Zahlen der Responder im Vergleich zur Gesamtzahl der Spender angegeben. Während die Zellen aller Probanden und Melanompatienten mit Proliferation auf den CD3/OKT3 mAk reagierten sind es bei Leukämiepatienten nur 82%, darunter mehr Frauen als Männer. Fisher's exact test * $p < 0,05$.

Eine Stimulation mit den CD3 Hybridomklon OKT3 führte bei Leukämiepatienten anders als bei den Kontrollprobanden sowie den Melanompatienten, nicht in allen Fällen zu einer Proliferation der Spenderzellen. Insgesamt reagierten nur die Zellen von 82% der Patienten auf eine Stimulation mit CD3/OKT3 mAk. Dabei war auch für die mitogene Wirkung von CD3/OKT3 mAk ein Geschlechtsdimorphismus zu beobachten. Während die T Zellen von 91% der weiblichen Leukämiepatientinnen proliferierten, war dies nur bei 71% der männlichen Patienten der Fall (vgl. Abb. 12).

Es stellte sich die Frage, ob ein genetischer oder ein „Priming“ Effekt hinter dem Responder/Non-Responder Status steckt. Wenn es genetisch determiniert ist Responder oder Non-Responder zu sein, würde dies implizieren, dass weibliche Responder anfälliger für gewisse Krebserkrankungen wie Leukämie oder Melanom seien. Ein „Priming“ Effekt würde zugrunde legen, dass die Zellen aufgrund von Umwelteinflüssen wie beispielsweise Nahrung, Stress oder Erkrankungen vorbereitet wären schneller auf eine CD3 Stimulation zu reagieren.

3.5 Ist es genetisch determiniert Responder oder Non-Responder zu sein?

Da die CD3 mAk Stimulation nicht an isolierten T Zellen sondern an PBMC untersucht wurde, sollte im Folgenden der mögliche Einfluss anderer PBMC Subpopulationen analysiert werden.

3.5.1 Welchen Einfluss haben Monozyten bei der CD3 mAk induzierten T Zell Proliferation?

In der vorangegangenen Masterarbeit zeigte sich bereits, dass die Reduktion von Monozyten in einigen, allerdings nicht in allen Fällen zu einer Inhibition der PBMC-Proliferation führte. Dabei war dieser inhibitorische Effekt deutlicher für eine Stimulation mit CD3/OKT3 mAk als für CD3/UCHT-1 mAk zu beobachten. Durch weitere Versuche in der vorliegenden Arbeit, stellte sich heraus, dass es bei der Reduktion der Monozyten entscheidend ist, wie groß der zurückbleibende Anteil dieses Zelltyps ist. Bereits ein Monozytenanteil von 0,6% kann ausreichen um eine Proliferation der Zellen durch CD3 mAk zu ermöglichen. Werden die Monozyten allerdings komplett aus den PBMC entfernt ($\leq 0,5\%$), so wird ausnahmslos keine Proliferation induziert. Dies gilt sowohl für CD3/UCHT-1 mAk als auch für CD3/OKT3 mAk stimulierte Zellen (siehe Abb. 14 A und B). Diese Erkenntnis rückte die Monozyten-Hypothese der 80er Jahre zurück in den Fokus der Untersuchungen. Die Hypothese besagt, dass eine Proliferation von T Zellen durch CD3 mAk nur möglich ist, wenn der Antikörper sowohl an den CD3 Rezeptor der T Zelle als auch an Fc γ -Rezeptoren von Monozyten bindet (Looney et al. 1986). Um dies zu überprüfen wurden PBMC von Non-Respondern neben CD3- zusätzlich mit anti-Maus IgG (α mIgG) Antikörper inkubiert. Die α mIgG Antikörper sind aus dem Kaninchen gewonnene Antikörper gerichtet gegen den IgG-Teil von Mausantikörpern und können daher an den Fc Teil von CD3/UCHT-1 und CD3/OKT3 binden. Kaninchen-Antikörper sind dafür bekannt mit ihrem Fc Teil sehr effizient an Fc γ -Rezeptoren (besonders CD16) von humanen Monozyten zu binden (Shashidharamurthy et al. 2010,). Daher sollte dieser Antikörper als Verbindungsglied zwischen dem an die T Zelle gebundenen CD3 mAk und dem Fc γ -Rezeptor auf dem Monozyt fungieren.

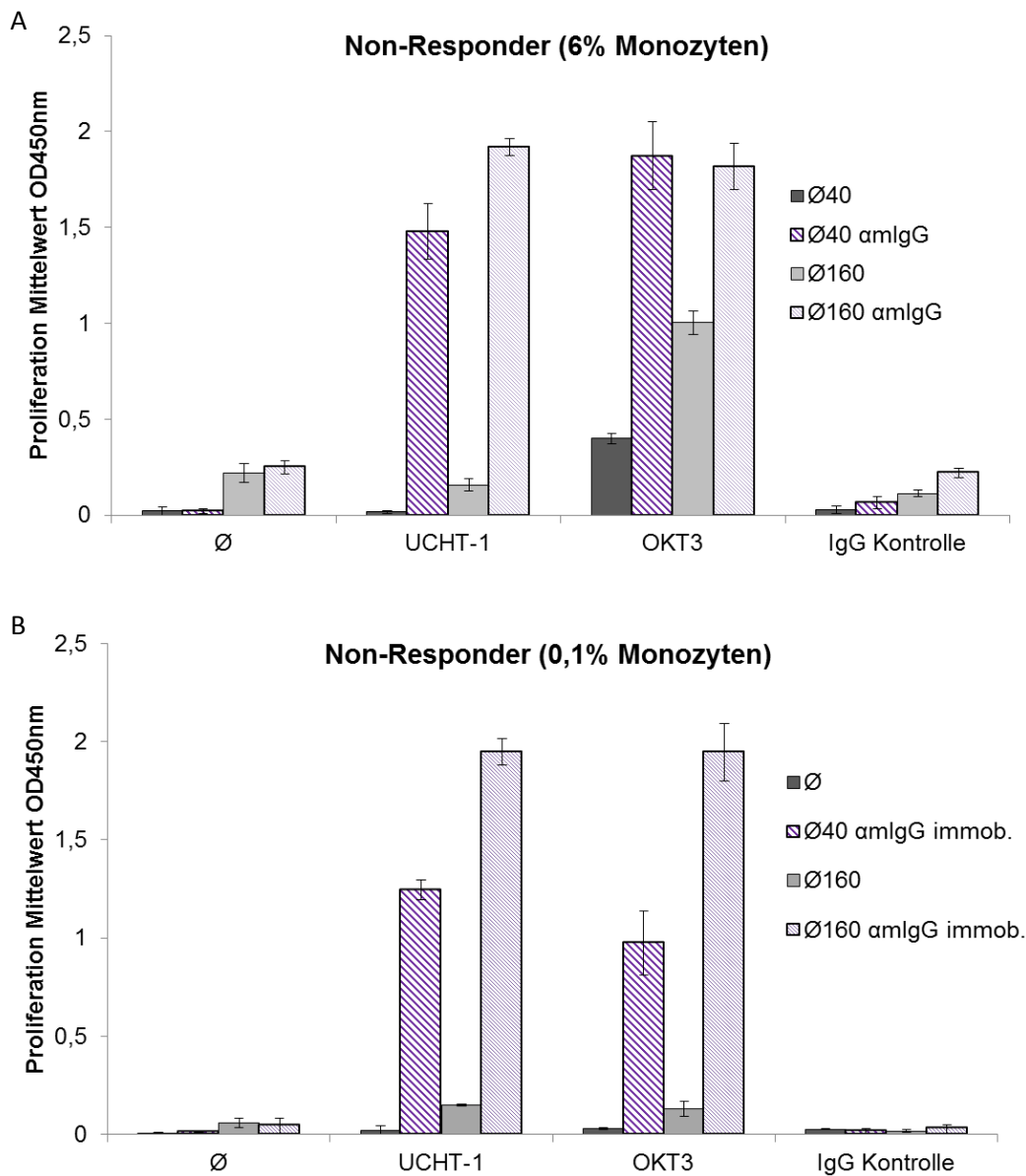


Abbildung 14 Monozyten dienen als Gerüst bei T Zell Stimulation durch CD3 mAk. Auswertung des BrdU-Proliferations-ELISA eines Non-Responder mit 40×10^3 Zellen/Well ($\emptyset 40$, volle dunkelgraue Balken) und 160×10^3 Zellen/Well ($\emptyset 160$ volle hellgraue Balken) jeweils in Kombination mit ($\emptyset 40$, violett gestreift; $\emptyset 160$, flieder gestreift) und ohne ($\emptyset 40$ hellgrau, $\emptyset 160$ dunkelgrau) anti-Maus IgG Antikörper ($\alpha mIgG$). Neben der Stimulation mit CD3 mAk (UCHT-1 und OKT3) gab es zwei Negativ-Kontrollen: nur mit Medium (\emptyset) und eine Isotypkontrolle mit Kontrollantikörper Be9.2. A) PBMC mit einem Monozytenanteil von 6% zeigten lediglich für die CD3 mAk Stimulation mit OKT3 eine Proliferation. In Kombination mit dem $\alpha mIgG$ Antikörper kam es jedoch auch durch CD3/UCHT-1 zu einer Proliferation B) Zellen mit Monozyten die auf einen Anteil von 0,1% reduziert wurden konnten nicht durch CD3 mAk stimuliert werden. Eine Stimulation mit CD3 Antikörpern der Zellen in Ko-Inkubation mit am Plattenboden immobilisiertem $\alpha mIgG$ hingegen führte zu einer starken Zellproliferation.

In Abbildung 14 A ist der Proliferationstest der PBMC eines Non-Responder, mit einer Zellzahl von 40×10^3 Zellen/Well ($\emptyset 40$) sowie einer Zellzahl von 160×10^3 Zellen/Well ($\emptyset 160$) dargestellt. Mit der niedrigeren Zellzahl kommt es nur zu einer geringen Zellproliferation durch die Stimulation mit CD3/OKT3 mAk, wohingegen diese bei 160×10^3

Zellen/Well deutlich stärker ausfällt. Die Kontrollen sowie eine Stimulation mit CD3/UCHT-1 mAk führten für beide Zellzahlen nicht zur Proliferation der Zellen. Wurden die Zellen jedoch zusätzlich zum CD3 mAk noch mit dem α mIgG Antikörper behandelt, kam es zu einer starken Proliferationsantwort. Für beide Zellzahlen wurde die CD3/OKT3 mAk Stimulation so weit gesteigert, dass beim BrdU Proliferationstest eine OD_{450nm} von 2 gemessen wurde. Obwohl es sich um einen Non-Responder handelte, führte auch CD3/UCHT-1 in Kombination mit dem Kaninchen-Antikörper α mIgG zu einer starken Induktion der T Zell Proliferation. Der α mIgG Antikörper ohne CD3 Stimulus hatte hingegen keinen Einfluss auf PBMC. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der durch CD3 mAk ausgelöste proliferative Effekt von der Bindung des Fc Teils des CD3 mAk abhängig ist. Es wurde durch die Untersuchung dreier weiterer Non-Responder bestätigt (Daten nicht gezeigt). Unklar ist, ob die Monozyten als eine Art Gerüst dienen und die CD3 Rezeptoren quervernetzen oder ob die Bindung an die Fc γ -Rezeptoren der Monozyten eine Stimulation dieser auslöst, die wiederum durch z.B. Freisetzung von Zytokinen zur Proliferation der T Zellen führt.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden erneut die PBMC des zuvor getesteten Non-Responder genutzt. Die Monozyten wurden reduziert und der α mIgG Antikörper vor der Inkubation am Plattenboden immobilisiert, um die Bindung an Monozyten zu simulieren. Wie in Abbildung 14 B zu sehen, führt die Reduktion der Monozyten auf einen Anteil von unter 0,2% dazu, dass durch eine CD3 mAk Stimulation sowohl bei 40×10^3 Zellen/Well als auch bei 160×10^3 Zellen/Well weder für CD3/UCHT-1 noch für CD3/OKT3, eine Proliferation zu messen ist. Eine Stimulation mit CD3 mAk und immobilisiertem α mIgG Antikörper hingegen, bewirkt bei beiden Zellzahlen auch in Abwesenheit von Monozyten eine deutliche Proliferation. In diesem Fall zeigte sich eine stärkere Proliferation für die höhere Zellzahl, wohingegen in den nicht Monozyten-reduzierten PBMC der α mIgG Antikörper bei der niedrigeren Zellzahl zu einer teils stärkeren Proliferation führt.

Aus der Kombination der Ergebnisse von Monozyten-Reduktion und dem Einsatz von α mIgG Antikörper lässt sich schließen, dass die Monozyten als Gerüst dienen und ihrerseits keine notwendigen weiteren Faktoren zur Proliferation beitragen. Eine Immobilisierung des CD3/UCHT-1 mAk allein ist nicht ausreichend um eine Proliferation in Zellen von Non-Respondern auszulösen (Daten nicht gezeigt).

3.5.1.1 Was passiert mit den Monozyten während einer CD3 mAk Stimulation?

Die Bindung der CD3 mAk an die Monozyten hat eine Wirkung auf diese Zellen. Dies zeigte sich, da bereits 24 h nach einer CD3/OKT3 Stimulation eine Reduktion der Monozyten festzustellen war.

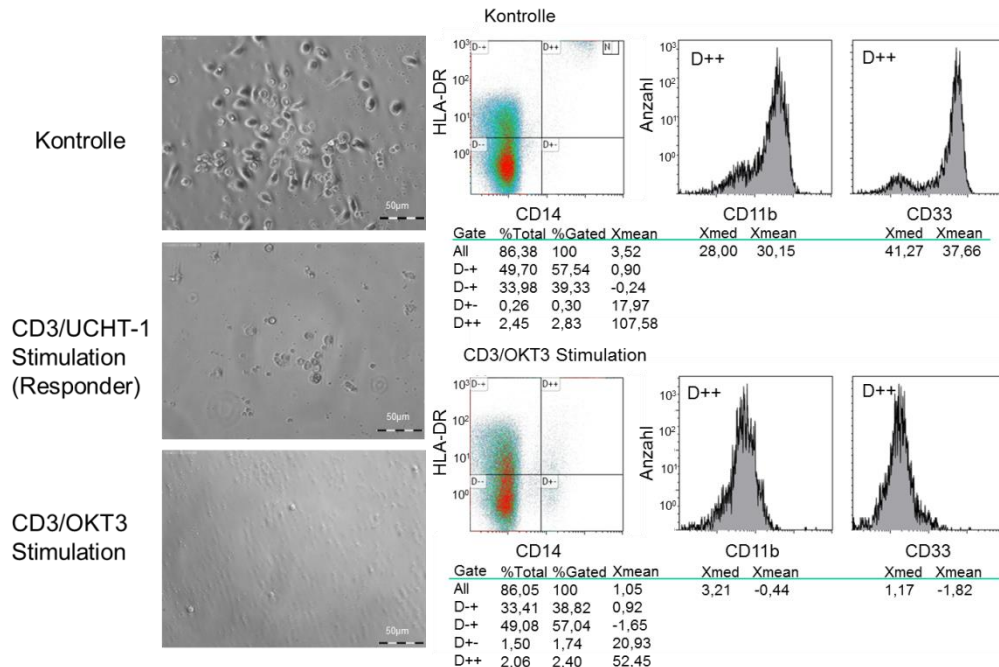


Abbildung 15 Der Monozytenanteil verringert sich nach einer CD3 mAk induzierten Proliferation. Links im Bild sind die Zellen eines Responder auf dem Boden des Inkubationsgefäßes nach dreitägiger Inkubation mit den verschiedenen Stimuli gezeigt. 10-fache Vergrößerung, Balken \triangleq 50 μ m. Die Platten wurden einmal mit PBS gewaschen und für drei weitere Tage mit Vollmedium kultiviert. Die durchflusszytometrischen Bilder rechts zeigen die durchflusszytometrische Auswertung des nach der Stimulation abgenommen Überstandes. Im Punktdiagramm ist HLA-DR gegen CD14 aufgetragen. In den Histogrammen sind die CD14 positiven Zellen aus dem Punktdiagramm mit den Monozytenmarkern CD11b bzw. CD33 aufgetragen. Für eine CD3/OKT3 mAk Stimulation von PBMC ließen sich Monozyten nach einer dreitägigen Inkubation weder auf dem Plattenboden noch im Medium nachweisen.

Bei der Inkubation von PBMC bei 37°C und 5% CO₂ in Zellkulturplastik adhärten die in den PBMC enthaltenen Monozyten am Plattenboden. Dies galt sowohl für die Zellkontrolle ohne Antikörper (Daten nicht gezeigt), als auch für die Isotypkontrolle (IgG1 und IgG2, Abb. 15 zeigt IgG1). Mit der Zeit differenzierten sie zu Makrophagen und dendritischen Zellen. Wurden die Zellen allerdings mit löslichem CD3/OKT3 mAk stimuliert, waren keinerlei adhärenente Zellen auf dem Plattenboden nachzuweisen. Eine Stimulation mit CD3/UCHT-1 mAk zeigte bei Respondern eine stark verminderte Anzahl von Monozyten/Makrophagen am Plattenboden (Abb. 15), wohingegen bei Non-Respondern eine mit der Kontrolle vergleichbare Monozytenadhäsion beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Mit dem Nachweis der Oberflächenmarker CD14, CD11b und CD33 wurde überprüft, ob die

Monozyten als Suspensionszellen im Überstand der CD3 mAk stimulierten Zellen verbleiben und lediglich an der Adhärenz gehindert werden. Weder für eine Stimulation mit CD3/OKT3 noch mit CD3/UCHT-1 mAk konnten Monozyten im Überstand detektiert werden (vgl. Abb. 15). Daher kann davon ausgegangen werden, dass Monozyten besonders bei der Stimulation durch CD3/OKT3 mAk sterben. Die Abwesenheit von Monozyten konnte bereits nach 20 h beobachtet werden, daher scheinen sie bei der CD3 mAk Stimulation nach ihrer Aufgabe als „FcR-tragendes Gerüst“ bei der CD3 mAk Stimulation in Apoptose über zu gehen.

3.5.2 Welche Fcγ-Rezeptoren sind für die mitogene Wirkung der CD3 mAk notwendig?

Im humanen System sind drei verschiedene Fcγ-Rezeptortypen: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) bekannt. Von der Monozyten-Hypothese inspiriert, stellte sich die Frage, ob Monozyten von Respondern und Non-Respondern die gleichen FcRys tragen. Daher wurde das Profil für beide Gruppen humaner FcγR durchflusszytometrisch untersucht.

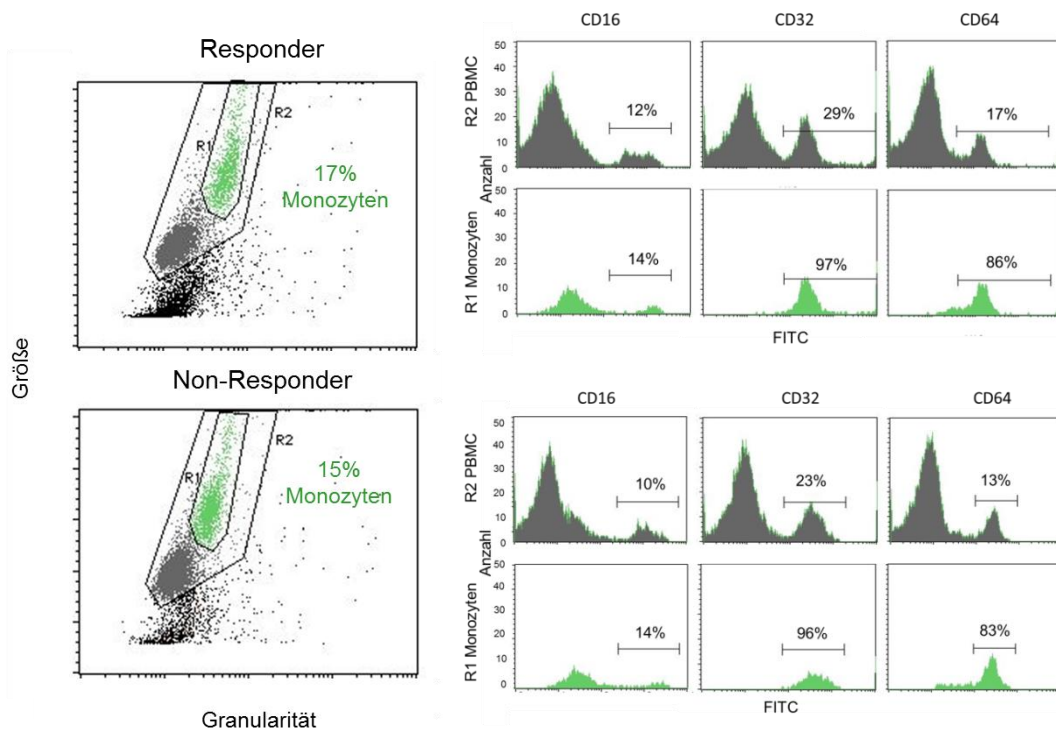


Abbildung 16 FcγRezeptoren sind auf Monozyten von Respondern und Non-Respondern gleich verteilt. Durchflusszytometrische Messung der drei humanen Fcγ-Rezeptoren an frisch isolierten PBMC eines Responder sowie eines Non-Responder. Im Punktdiagramm ist die Größe gegen die Granularität der Zellen aufgetragen. Die Markierung R1 umrandet die in grün dargestellten Monozyten. Die Markierung R2 beinhaltet neben den Monozyten auch die in grau dargestellten Lymphozyten. Die Histogramme auf der rechten Seite der Abbildung zeigen die Auswertung der Messung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die Fcγ-Rezeptoren anhand der relativen Fluoreszenz. Über der Markierung lassen sich die prozentualen Anteile der drei Fcγ-Rezeptoren ablesen. Der CD16 Rezeptor war nur auf 14% der Monozyten zu finden. Die Rezeptoren CD32 und CD64 hingegen waren auf nahezu allen Monozyten vorhanden, wobei CD32 auch auf weiteren Zellen unter den PBMC zu finden sein muss.

Pro Gruppe wurden jeweils vier unabhängige Spender getestet. In PBMC von gesunden Spendern konnten CD16 Rezeptoren (FcR γ III) auf 10% bis 15% der Zellen gemessen werden. CD32 (FcR γ II) zeigte sich auf 15% bis 30% und CD64 (FcR γ I) bei 8 bis 19% aller Zellen (Abb. 16). In Abbildung 16 ist für zwei repräsentative Spender (Responder und Non-Responder) der Anteil an Fc γ -Rezeptoren in der gesamten PBMC Population sowie im speziellen auf den Monozyten zu sehen. Dabei lag der Anteil der Monozyten bei den in Abb. 16 dargestellten Spendern bei 17% respektive 15%. Lediglich 14% dieser Monozyten trugen den CD16 Rezeptor, wohingegen der CD32 Rezeptor auf nahezu allen Monozyten exprimiert war. Von den 29% CD32 tragenden Zellen in den PBMC des dargestellten Responders waren somit 17% auf Monozyten (Anteil aller Monozyten an den PBMC) und 12% auf weiteren Zellen verteilt. Ähnliches zeigte sich auch für den Non-Responder. Der CD64 Rezeptor war zu über 80% auf den Monozyten exprimiert. Da es insgesamt nur 17% respektive 13% CD64 tragender Zellen gab, waren in den PBMC von Respondern sowie Non-Respondern somit fast ausschließlich die Monozyten CD64 positiv. Lediglich CD32 sowie CD64 waren aufgrund ihrer Bindungseigenschaften für IgG wichtig für das vorliegende Projekt, daher wird CD16 im Weiteren nicht behandelt.

CD3/UCHT-1 ist ein IgG1 mAk und CD3/OKT3 ein IgG2 mAk, dabei wird murines IgG1 von CD32 erkannt und murines IgG2 von CD64. Wie aber in Abb. 16 gezeigt, werden sowohl CD64 (erkennt IgG2 von CD3/OKT3) als auch CD32 (erkennt IgG1 von CD3/UCHT-1) bei den PBMC von Respondern und Non-Respondern gleich stark exprimiert. Maus IgG1 wird allerdings nicht von allen, sondern lediglich vom CD32 Rezeptor Isotyp CD32a erkannt.

In diesem Rezeptor Isotyp gibt es einen Polymorphismus, welcher in der Bindungsregion des Rezeptors liegt (Dijstelbloem et al. 2001). Dabei verändert ein Basenaustausch eine Aminosäure in der Bindungsregion des CD32a Moleküls.

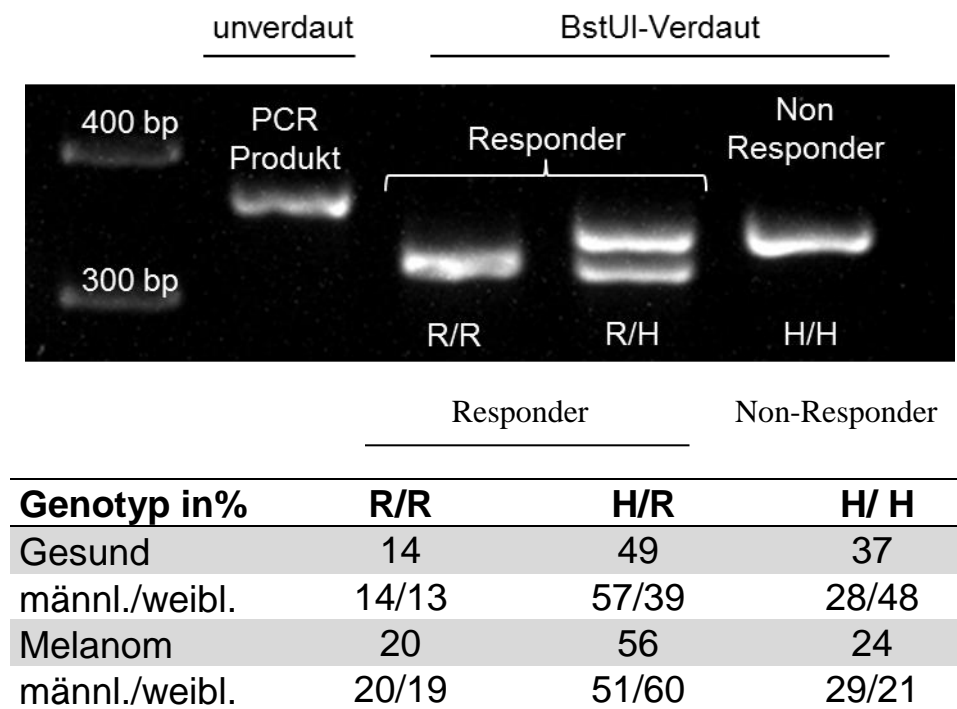


Abbildung 17 Responder und Non-Responder zeigen unterschiedliche Allotypen des CD32a Gens. Durch PCR wird ein Fragment des CD32a Gens, welches den Abschnitt mit der Aminosäure 166 enthält, amplifiziert. Mit Hilfe des antisense Primers wird eine BstUI Schnittstelle in die Sequenz eingebracht. Responder haben durch die Aminosäure Arginin (R) mit der Gensequenz CGT eine weitere BstUI Schnittstelle im amplifizierten PCR Produkt. Daher wird das PCR Produkt bei Non-Respondern beim BstUI Verdau nur einmal geschnitten, wohingegen es bei Respondern zwei Mal geschnitten wird. Da „Responder“ ein dominantes Merkmal ist, zählen auch heterozygote Spender, welche zwei Banden nach dem Verdau zeigen, zu den Respondern. Die Aufnahme der gelelektrophoretischen Auftrennung zeigt die charakteristischen CD32a Bandenmuster für Responder (R/R, R/ H) und Non-Responder (H/ H) nach einem BstUI-Verdau. Die Tabelle (unten) zeigt den prozentualen Anteil der Genotypenverteilung in den verschiedenen Versuchsgruppen. Der Non-Responder Genotyp kam in gesunden Probanden deutlich häufiger vor als in Melanompatienten. Das häufigere Auftreten von Respondern in Melanompatienten verteilt sich gleichmäßig auf homo- und heterozygote Responder.

Es zeigte sich, dass ein CD32a Rezeptor der ein Arginin (R) trägt Maus-IgG1binden konnte. Kam an dieser Stelle allerdings ein Histidin (H) vor, war diese Bindung nicht möglich. Der Aminosäureaustausch befindet sich dabei an der Aminosäureposition 166, nicht wie zuvor beschrieben bei an der Position 131 (Jiang et al. 1996). Mittels einer PCR konnte der Genotyp des jeweiligen Probanden bestimmt werden. Dadurch wurde gezeigt, dass Probanden der Kontrollgruppe die homozygot für den Histidin-tragenden Rezeptor waren zu 100% Non-Responder waren sowie anders herum, dass homo- und heterozygot Arginin-tragende Rezeptoren zu 100% mit dem Responder-Phänotyp korrelierten. Um nachzuweisen, dass eine durch CD3 mAk induzierte T Zell Proliferation von CD32a Rezeptoren auf umliegenden Zellen abhängig ist, wurden CD32a tragende CHO Transfektanten etabliert. Diese Zellen exprimieren den humanen CD32a Rezeptor der einem Responder (CHO CD32a R/R) bzw. einem Non-Responder (CHO CD32a H/H) entspricht.

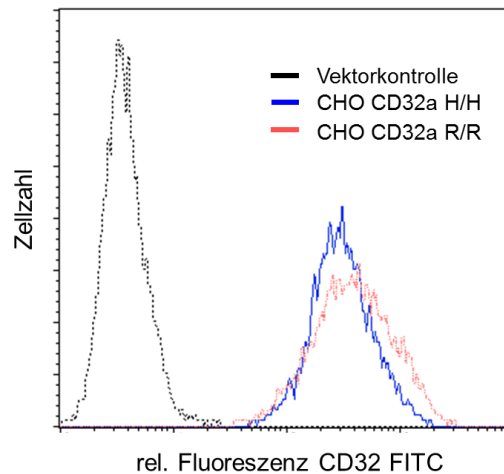


Abbildung 18. Die ausgewählten CHO Transfektanten zeigen zu 100% eine starke Expression des CD32a Rezeptors. Nach der Subklonierung wurden die Klone im Durchflusszytometer auf die Expression des CD32 Rezeptors untersucht. Die relative Fluoreszenz zeigt, dass nur Klone gewählt wurden die zu 100% CD32 positiv waren.

Es wurde nur mit stabil transfizierten CHO Zellen gearbeitet, die nach der Selektionierung zu 100% den CD32 Rezeptor exprimierten (vgl. Abb. 18). CHO CD32a R/R Zellen wurden mit dem Arginin tragenden Fc γ IIa Rezeptors eines homozygoten Responder transfiziert und CHO CD32a H/H Zellen mit dem Histidin tragenden Fc γ IIa Rezeptors eines Non-Responder. Somit konnten die CHO Transfektanten als CD32a tragendes Gerüst eingesetzt werden.

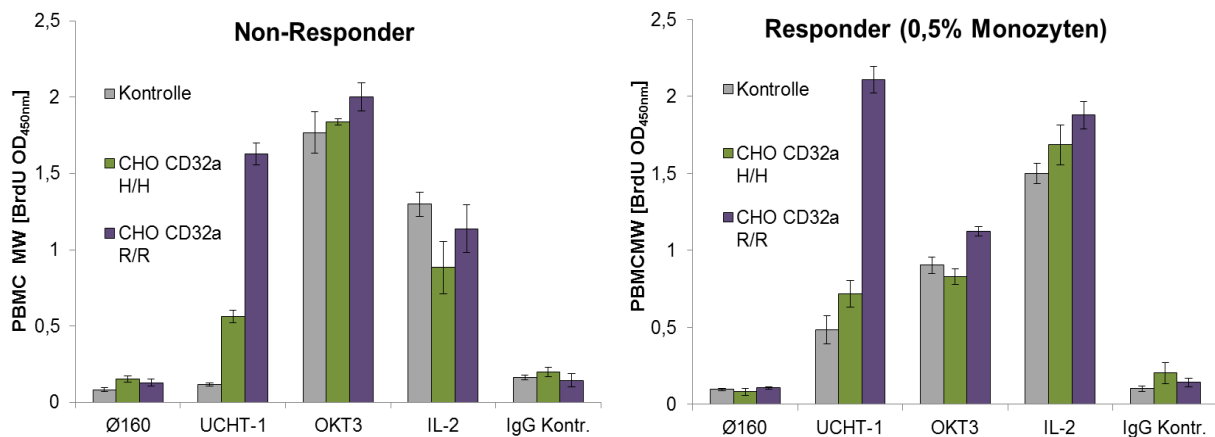


Abbildung 19 Der Responder/Non-Responder Phänotyp wird durch den Allotyp des CD32a Rezeptors bedingt. Inkubation frisch isolierter PBMC eines Non-Responder sowie eines Responder (Monozytenanteil zuvor auf 0,5% reduziert) auf fixierten CHO Transfektanten mit dem CD32a H/H Rezeptor eines Non-Responder (grün) sowie CD32a R/R eines Responder (violett). Die PBMC wurden mit CD3 (UCHT-1 und OKT3) stimuliert, zudem gab es zwei Negativ-Kontrollen: nur Medium (Ø) und eine Isotypkontrolle mit dem Kontrollantikörper Be9.2 sowie eine Positiv-Kontrolle mit IL-2. Aufgetragen ist der Mittelwert (MW) der BrdU Messung bei OD_{450nm} für die verschiedenen Stimulationsansätze. Durch Ko-Inkubation mit CHO CD32a R/R Zellen konnte eine CD3/UCHT-1 induzierte Proliferation von Non-Responder Zellen sowie Monozyten-reduzierten Responder PBMC bewirkt werden. Repräsentative Spender (n=6).

In Abbildung 19 sind die BrdU-Proliferationsprofile eines repräsentativen Responder sowie Non-Responder abgebildet. Für die Zellen des Non-Responder zeigen die hellgrauen Balken eine typische Proliferationsauswertung für PBMC eines gesunden Probanden. In der Zell- und Isotyp-Kontrolle sowie für die CD3/UCHT-1 Stimulation war keine Proliferation nachweisbar, für CD3/OKT3 und die positiv Kontrolle IL-2 hingegen zeigten die hohen OD_{450nm}-Werte des BrdU Assays eine starke Proliferation an. Die grünen und violetten Balken stehen für Zellen, die auf PFA fixierten CHO Zellen inkubiert wurden. Die grünen Balken stellen fixierte CHO Zellen dar, welche den Non-Responder Rezeptor CD32a H/H mit einem Histidin in der Bindungsregion tragen. Die violetten Balken hingegen zeigen die Ergebnisse für Zellen, die mit fixierten CHO Zellen, welche den Arginin tragenden Responder Rezeptor CD32a R/R exprimieren, ko-kultiviert wurden. Die Ko-Kultivierung mit CD32a tragenden CHO Zellen (grüne und violette Balken) zeigte in den Kontrollen sowie im Stimulationsansatz mit CD3/OKT3 mAk keinen Unterschied zu den Ansätzen ohne CD32a Präsenz (graue Balken). Der Unterschied zeigte sich, wie zu erwarten, bei den Ansätzen der CD3/UCHT-1 mAk Stimulation. Bereits beim Einsatz von CHO Zellen mit dem Non-Responder Rezeptor (CHO CD32a H/H, grüne Balken) kam es zu einer mäßigen Proliferation der Non-Responder Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden allerdings auch bei der Ko-Kultivierung mit untransfizierten CHO Zellen erreicht (Daten nicht gezeigt). Stimulierte man PBMC eines Non-Responder mit CD3/UCHT-1 mAk während einer Ko-Kultivierung mit CHO CD32a R/R Zellen (violette Balken), zeigte sich eine starke Proliferation. Diese entsprach einer Stimulation mit CD3/OKT3 mAk (graue Balken).

Für die Versuche mit PBMC eines Responder wurden zunächst die Monozyten reduziert. In dem in Abb. 19 gezeigten Beispiel konnte der Anteil an Monozyten auf 0,5% reduziert werden. Der Proliferationsassay für diese PBMC wies keine Proliferation in den Negativkontrollen, eine starke Proliferation in der Positivkontrolle mit IL-2 sowie dem Stimulationsansatz mit CD3/OKT3 mAk auf. Auch auf eine Stimulation mit CD3/UCHT-1 mAk reagierten die Zellen trotz Monozytenreduktion noch mit einer mäßigen Proliferation. Eine Ko-Kultivierung dieser Ansätze mit den CHO CD32a H/H Zellen zeigte ein mit der Kontrolle vergleichbares Bild. Wurden die Zellen allerdings mit CHO CD32a R/R Zellen ko-kultiviert, so kam es zu einem drastischen Anstieg der CD3/UCHT-1 mAk induzierten Proliferation. Für die restlichen Ansätze jedoch, wies auch die Ko-Kultivierung mit der Kontrolle vergleichbare Ergebnisse auf.

Diese Versuche belegen die Korrelation zwischen dem CD32a Genotyp und dem Responder/Non-Responder Phänotyp eindeutig.

3.6 Wie kann der Responder/Non-Responder Status am effizientesten nachgewiesen werden?

Potentiell wird die Kenntnis über den Responder/Non-Responder Status eines Patienten eines Tages im Zuge der personalisierten Medizin von Bedeutung sein. Zur Identifizierung dieses Status eines Blutspenders wurden in der vorliegenden Arbeit Proliferationsassays (phänotypische Charakterisierung) und PCR-Analysen mit anschließendem Restriktionsverdau (genotypische Charakterisierung) genutzt. Zur Messung der Proliferation ist eine Detektion der CD3 mAk stimulierten Zellen mit BrdU, CFSE oder eine kombinierte Messung der Größe und Granularität im Durchflusszytometer möglich. Bei dieser optischen Auswertung im Durchflusszytometer handelt es sich um eine schnelle, höchst zuverlässige und kostengünstige Methode um den Responder/Non-Responder Status einer Person zu analysieren. Dazu wird im Durchflusszytometer die Größe gegen die Granularität der zu untersuchenden PBMC gemessen und im Punktdiagramm aufgetragen.

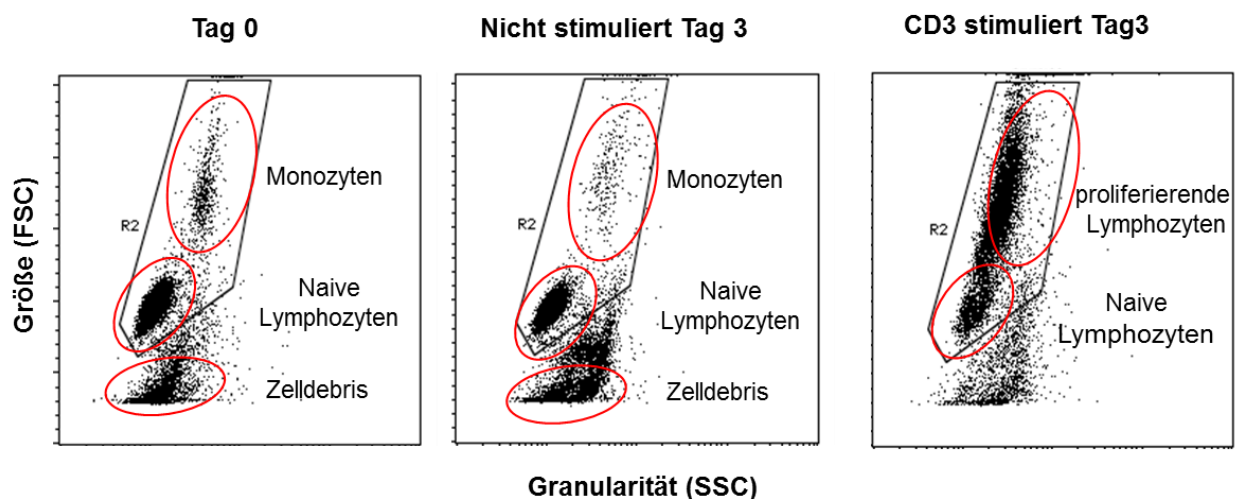


Abbildung 20 Proliferierende Zellen lassen sich im Durchflusszytometer anhand ihrer Größe und Granularität von naiven Zellen unterscheiden. PBMC wurden im Durchflusszytometer ohne Färbung gemessen und hinsichtlich der Größe gegen die Granularität im Punktdiagramm aufgetragen. Innerhalb der Markierung R2 sind Lymphozyten sowie Monozyten zu sehen. Außerhalb des Rasters liegen tote Zellen bzw. der Zelldebris. Frisch isolierte Zellen an Tag 0 zeigen ein kompaktes Signal von naiven Lymphozyten. Davon abgegrenzt ist eine länglichere Punktwolke von Monozyten, die durch ihre Größe höher im Punktdiagramm liegen. Zellen, die drei Tage ohne Stimulus kultiviert wurden, zeigen ein ähnliches Bild wie an Tag 0, jedoch mit einer sichtbaren Minderung an Monozyten. Drei Tage nach einer Stimulation mit CD3 mAk ist keine Monozytenpopulation zu erkennen. Die Lymphozyten haben sich vergrößert und zeigen eine zum oberen Bildrand, leicht nach rechts führenden Schweif, indem sich proliferierende Zellen befinden.

Abbildung 20 zeigt, dass nicht stimulierte Zellen bei den in dieser Analyse gewählten Einstellungen des Durchflusszytometers eine charakteristische Population in der unteren, linken Hälfte des Punktdiagramms bilden. Diese besteht Lymphozyten. Monozyten bildeten

eine Population die höher und leicht links liegt, da die Zellen größer und etwas granulärer/vesikulärer sind als Lymphozyten. Unterhalb des Rasters R2 wird der Zelldebris abgebildet. Stimuliert man PBMC eines Responder mit CD3/UCHT-1 und misst diese nach drei Tagen im Durchflusszytometer, sind keine Monozyten mehr von den Lymphozyten abgrenzbar, da sich die Lymphozyten in Größe und Granularität deutlich verändert haben. In dem zum oberen Bildrand führenden Schweif befinden sich proliferierende T Lymphozyten. Die optische Auswertung von Zellen eines Non-Responder nach drei tägiger Stimulation mit CD3/UCHT-1 entsprach dem Bild der nicht stimulierten Zellen (Daten nicht gezeigt). Daher konnte anhand der Form von CD3/UCHT-1 mAk stimulierten Zellen in der Auftragung Größe gegen Granularität im Durchflusszytometer ohne großen Aufwand deutlich zwischen nicht stimulierten Zellen (Non-Responder) und stimulierten Zellen (Responder, phänotypisch) unterschieden werden. Bei der optischen Auswertung (FSC/SSC) des Responder/Non-Responder Status handelte es sich um ein einfaches, kostengünstiges, hoch reproduktives und schnelles Messverfahren (Durchflusszytometrie). Zuvor war allerdings die Isolierung von PBMC sowie eine Stimulation mit anschließender mindestens zweitägiger Inkubation der Zellen nötig. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein ELISA entwickelt der bereits am Tag der Blutabnahme den Status des Spenders aufzeigen kann.

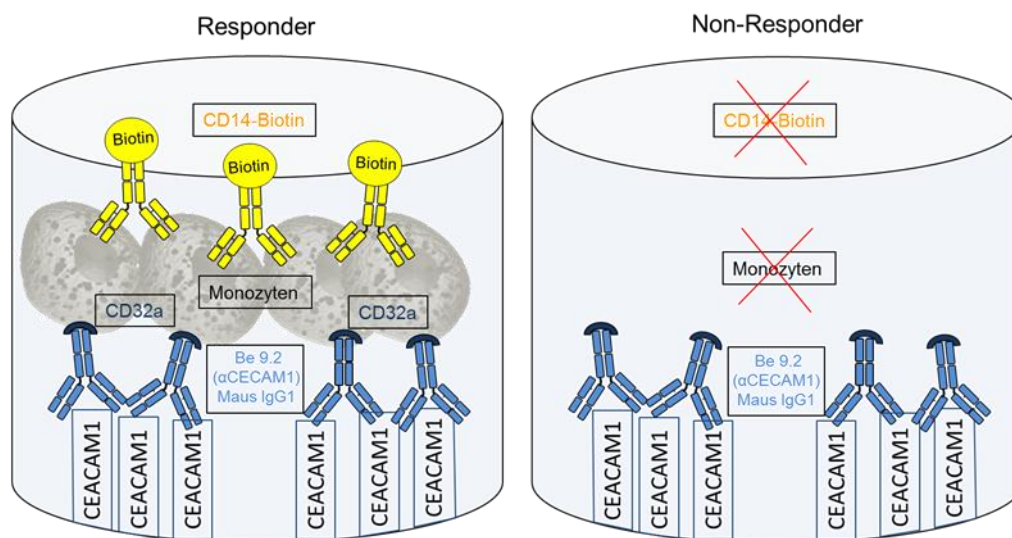


Abbildung 21 Responder/Non-Responder ELISA Schnelltest. CEACAM1 Moleküle sind am Plattenboden immobilisiert, daran binden die CEACAM1 erkennenden Be9.2 (IgG1) mAk. Monozyten aus Blutproben von Respondern können mit ihren Fcγ-Rezeptoren (CD32a) an den Fc Teil der Be9.2 Antikörper binden und werden von Biotin gekoppelten CD14 Antikörpern erkannt. TMB kann mit HRP umgesetzt, mit Schwefelsäure abgestoppt und schließlich im Mikrotiterplatten Messgerät ausgewertet werden. Die Monozyten von Non-Respondern könnten aufgrund ihres CD32a Rezeptor-Allotyps nicht an Be9.2 binden, weiter könnte auch kein CD14 und HRP binden und TMB würde nicht zu einem Farbumschlag führen.

Um den Responder/Non-Responder Status zu testen, sollte die Bindung der Monozyten an murines IgG1 analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde der *in house* hergestellte Be9.2, ein

muriner IgG1 Antikörper der gegen CEACAM1 der Ratte gerichtet ist, genutzt. Wie für CD3/UCHT-1 mAk, war eine Bindung des Fc γ -Rezeptors an immobilisierten Be9.2 mAk nicht möglich. Um also den IgG-Teil der Antikörper zu präsentieren wurde zunächst das Lysat von CEACAM1 positiven NBTII Zellen am Plattenboden immobilisiert. NBTII (Nara Bladder Tumor) sind Rattenzellen gewonnen aus einem Blasentumor, die endogen CEACAM1 tragen. Nach einer Blockierung mit BSA konnte nun der Be9.2 mAk an die CEACAMs des Lysats binden und die freien Maus-IgG1 Fc Teile wurden präsentiert. Wenn anschließend Monozyten eines Responder in die CEACAM1 bedeckten Wells gegeben wurden, banden die CD32a Rezeptoren der Zellen an den IgG1 Fc Teil des Be9.2. Daraufhin wurden die Monozyten mit Hilfe eines CD14 Biotin Antikörpers detektiert, weiter mit Streptavidin-HRP inkubiert, mit TMB entwickelt und die Reaktion schließlich mit Schwefelsäure abgestoppt.

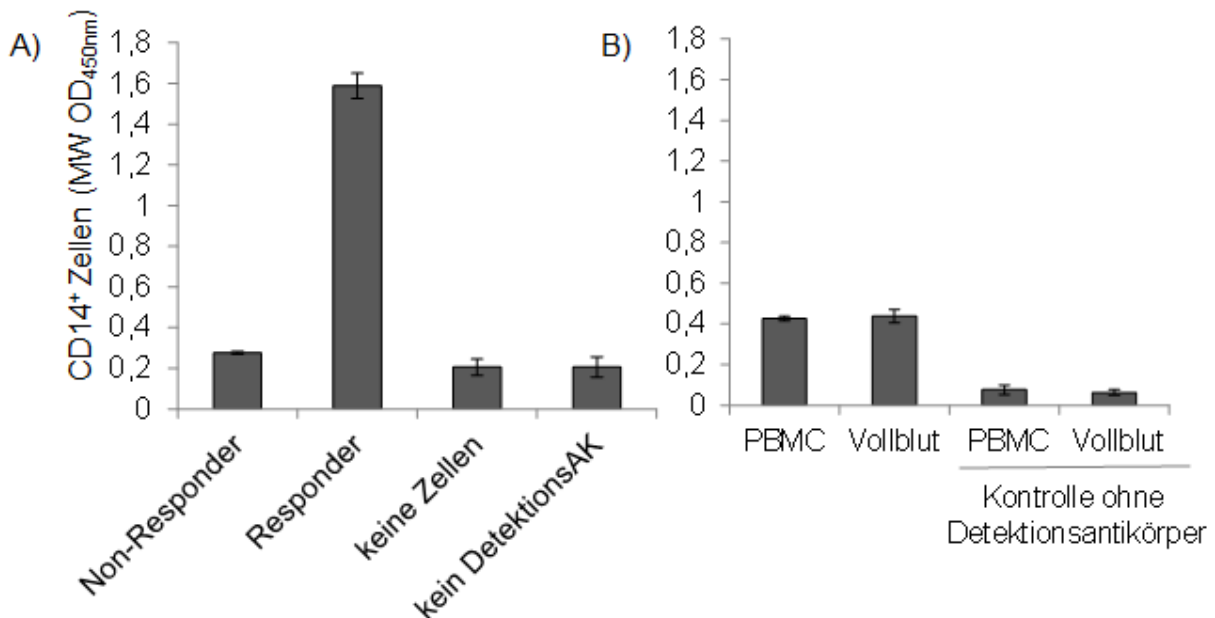


Abbildung 22 Sandwich-ELISA als Responder Schnelltest. Lysate einer endogen CEACAM1 tragenden Zelllinie wurde am Plattenboden immobilisiert und mit CEACAM1 erkennenden Maus IgG1 Antikörpern detektiert. Im Weiteren erfolgte eine Inkubation mit PBMC, wobei Monozyten mit einem Arginin₁₆₆ tragenden CD32a Rezeptor an den IgG1 Teil der Mausantikörper binden können. Diese wurden schließlich mit CD14-Biotin und Streptavidin-HRP markiert und durch Umsatz von TMB durch Schwefelsäure im Mikroplattenlesegerät ausgewertet. A) Non-Responder PBMC, die bei diesem Test eingesetzt wurden zeigen nur eine sehr geringe OD_{450nm}, vergleichbar mit den Werten der Kontrollen, bei denen der ELISA einmal ohne Zellen und einmal ohne Detektionsantikörper (DetektionsAk \triangleq CD14-Biotin) durchgeführt wurde. Dies spricht gegen eine Bindung der Monozyten. Mit PBMC eines heterozygoten Responder hingegen zeigte sich eine starke Detektion der CD14 Antikörper und somit eine Bindung der Monozyten von Respondern an die murinen IgG1 Antikörper. B) Die Zellen eines weiteren heterozygoten Responder zeigten im ELISA ein positives Signal mit einer mäßigen OD_{450nm} von 0,4, jedoch deutlich erhöht gegenüber der Kontrolle ohne Detektionsantikörper (CD14-Biotin). Der Einsatz von isolierten PBMC und Vollblut zeigte vergleichbare Ergebnisse. (Non-Responder n=4, Vollblut n=2; Responder: PBMC n=3, Vollblut n=2).

Die Auswertung des ELISA zeigt, dass bei Non-Respondern kein Signal für das Vorhandensein von Monozyten im Mikroplattenlesegerät messbar ist (repräsentativer Spender, n=4). In Abb. 22 A ist zu erkennen, dass bei den Kontrollen ohne Zellen bzw. ohne den Detektionsantikörper (CD14-Biotin) ein sehr geringes Signal mit einer OD_{450nm} von unter 0,2 gemessen wird. Die Werte für die Zellen des abgebildeten Non-Responder liegen nur knapp über 0,2, wohingegen die Werte für Zellen des Responder mit einer OD_{450nm} von über 1,6 deutlich höher liegen. In Abb. 22 B ist die Auswertung eines weiteren Responder zu sehen. Hierbei sollte getestet werden, ob anstelle von isolierten PBMC auch Vollblut für den ELISA verwendet werden kann. Der OD_{450nm}-Wert des Responder betrug nur 0,4 und ist damit immer noch deutlich von den Kontrollen, die bei einem Wert von unter 0,1 lagen, abgrenzbar. Zwischen dem Einsatz von Vollblut und isolierten PBMC zeigte sich kein Unterschied in der OD_{450nm}. Somit konnte in dem an dieser Stelle beschriebene ELISA bereits mit Vollblut eine Differenzierung zwischen Responder und Non-Responder stattfinden, wodurch die Isolation der Zellen und somit Zeit und Ressourcen gespart werden konnte.

3.7 Welchen Einfluss übt ein Ko-Stimulus auf die CD3 mAk induzierte T Lymphozyten Proliferation aus?

Bereits ohne Ko-Stimulus wirkte CD3/OKT3 mitogen auf die Zellen aller Spender und CD3/UCHT-1 wies eine mitogene Wirkung auf die Zellen von 60% der Spender auf. Wurden Zellen von Respondern mit CD3 mAk (UCHT-1 oder OKT3) und zusätzlichem α CD28 Ko-Stimulus inkubiert, zeigte sich in über 80% der Fälle eine gleichbleibende oder erhöhte Proliferation verglichen mit der Proliferation mit CD3 mAk ohne α CD28 Ko-Stimulus (vgl. Abb. 23).

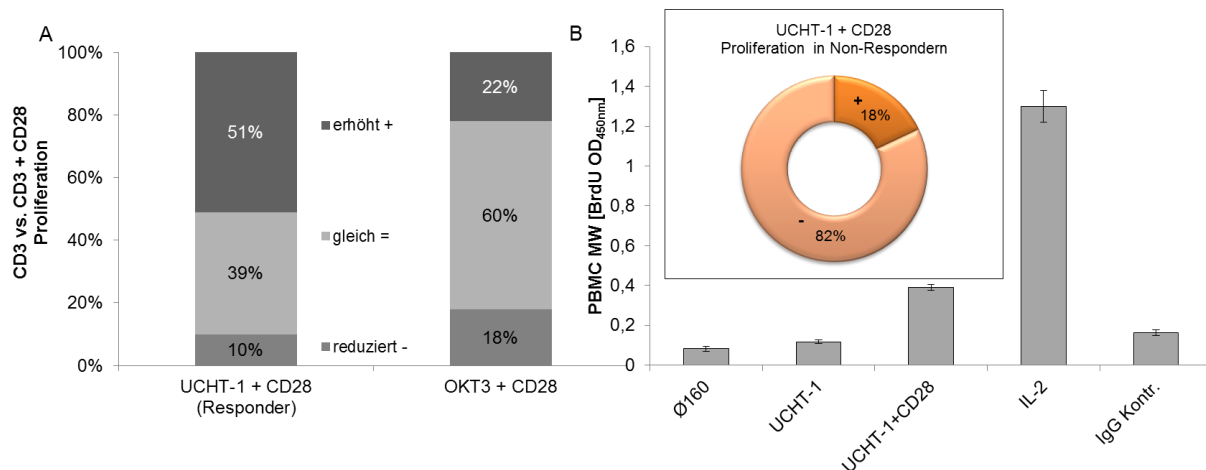


Abbildung 23 A) CD28 wirkt nicht in allen Fällen ko-stimulierend auf eine CD3 mAk induzierte Proliferation B) Zellen von 18% der UCHT-1 Non-Responder können durch Zugabe eines CD28 Ko-Stimulus proliferieren. A) Anteil an Probanden (für CD3/UCHT-1 nur Responder) in Bezug auf die Veränderung der BrdU Proliferationsauswertung zwischen einer CD3 (UCHT-1, OKT3) Stimulation und einer CD3 mAk Stimulation in Kombination mit dem α CD28 mAk Ko-Stimulus. In dunkelgrau ist der Anteil an Probanden dargestellt, deren CD3 mAk induzierte Zellproliferation durch den α CD28 mAk Ko-Stimulus erhöht wurde. In hellgrau ist der Anteil an Probanden mit einer gleichbleibenden Proliferation und in mittelgrau der Anteil an Probanden mit einer reduzierten Proliferationsantwort dargestellt. Von einer erhöhten bzw. reduzierten Proliferation im Vergleich CD3 mAk mit und ohne zusätzlichen Ko-Stimulus wurde ab einer Abweichung von mehr als 5% gesprochen. Für CD3/UCHT-1 wurden nur Responder untersucht, wobei der Großteil der Probanden eine gesteigerte Proliferation durch CD28 zeigte. Für CD3/OKT3 war die Proliferation für CD3 und CD3/CD28 in den meisten Fällen gleichbleibend. B) Frisch isolierte PBMC eines Non-Responder wurden mit CD3/UCHT-1 stimuliert, zudem gab es zwei Negativ-Kontrollen: nur Medium (Ø) und eine Isotypkontrolle mit Kontrollantikörper Be9.2 sowie eine Positiv-Kontrolle mit IL-2. Aufgetragen ist der Mittelwert (MW) der BrdU Messung bei einer OD_{450nm} für die verschiedenen Stimulationsansätze. Das Ringdiagramm veranschaulicht wie Non-Responder auf eine CD3/UCHT-1/CD28 Stimulation reagierten: + Proliferation, - keine Proliferation (n=72).

Für eine Stimulation mit CD3/UCHT-1 in Respondern zeigte sich für 51% der Spender eine gesteigerte Proliferation durch Zusatz des Ko-Stimulus α CD28 mAk. Die Proliferationsantworten der Ansätze wurden in BrdU-Proliferationsprofilen verglichen. Eine Proliferation induziert von CD3/UCHT-1 mAk steigerte sich dabei verglichen mit CD3/UCHT-1/CD28 mAks im Schnitt um 30%. Für 39% der Probanden bewirkte ein α CD28 Ko-Stimulus hingegen keine Änderung der Proliferation und für 10% der untersuchten Probanden führte die Ko-Inkubation mit α CD28 zu einer Verminderung der CD3/UCHT-1 mAk induzierten Proliferation. Für eine Stimulation mit CD3/OKT3 mAk und zusätzlichem α CD28 mAk Ko-Stimulus zeigte sich sogar in 18% der Fälle eine Reduktion der Proliferation. Die Reduktion der Proliferation betrug, gemessen an der BrdU Inkorporation, sowohl für CD3/UCHT-1 als auch für CD3/OKT3 etwa 20%. In den häufigsten Fällen (60%) hatte der zusätzliche α CD28 Ko-Stimulus jedoch keine Auswirkung auf die Proliferation der CD3/OKT3 mAk stimulierten Zellen. In 22% führte er zu einer gesteigerten Stimulation (vgl. Abb. 23). Erneut lag die Steigerung bei 20-30% höheren OD_{450nm}-Werten. Da sich zwischen

Respondern und Non-Respondern keine Unterschiede in der CD3/OKT3 induzierten Proliferation zeigten, wurden für diesen Antikörper beide Gruppen in die Auswertung einbezogen.

Für Non-Responder deren Zellen nicht mit Proliferation auf den CD3/UCHT-1 Stimulus reagierten, zeigten die Zellen von 18% der Spender durch eine Stimulation mit der Kombination von CD3/UCHT-1 mAk und α CD28 mAk Ko-Stimulus doch eine Induktion der Proliferation. In Abbildung 23 B sind die Ergebnisse eines repräsentativen Probanden zu sehen. Dabei liegen die OD_{450nm} Werte 100-150% höher als die Kontrollwerte (Zellkontrolle und Isotypkontrolle) und sind damit als signifikant, aber im Vergleich zur IL-2 positiv Kontrolle mit 1585% als gering bis mäßig erhöht einzuschätzen.

Welchen Einfluss der zusätzliche Ko-Stimulus auf das Überleben der Zellen hat, zeigte sich durch die Messung der apoptotischen Zellen nach einer dreitägigen Kultivierung.

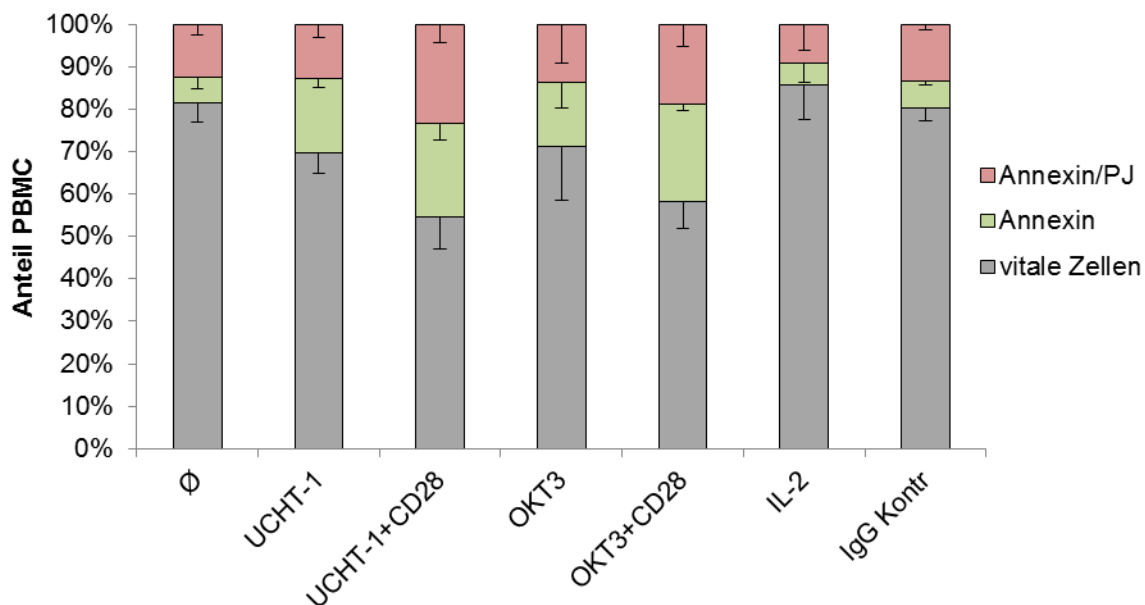


Abbildung 24 Bei einer CD3/CD28 mAk Stimulation von PBMC sterben mehr Zellen verglichen mit einer CD3 mAk Stimulation. PBMC von Respondern wurden für drei Tage kultiviert und anschließend mit einer AnnexinV, PI Doppelfärbung durchflusszytometrisch auf den Anteil toter Zellen untersucht. Die Balken stellen die Mittelwerte der Messung dreier unabhängiger Spender mit dazugehöriger Standardabweichung dar. In grau ist der Anteil vitaler Zellen für die verschiedenen Zellansätze gezeigt, in grün sind AnnexinV positive und PI negative (früh apoptotisch) Zellen und in rot der Anteil AnnexinV und PI positive (spät apoptotische) Zellen dargestellt. Im Vergleich zu den Kontrollen (Ø Zellkontrolle, IgG Isotypkontrolle, IL-2 Positivkontrolle) stieg der Anteil apoptotischer Zellen sowohl bei einer CD3 Stimulation als auch deutlich verstärkt bei einer zusätzlichen Ko-Stimulation mit α CD28 mAk (n=3).

In Abbildung 24 ist der Anteil lebender und apoptotischer Zellen für drei gesunde Responder zusammengefasst. In der Zellkontrolle (Ø) und der Isotypkontrolle (IgG) waren nach einer dreitägigen Kultivierung noch 80% der Zellen vital, nur etwa 5% der Zellen waren früh- und 15% spät apoptotisch. In der Positivkontrolle mit IL-2 überlebten sogar bis zu 85% der Zellen

die Kultivierung. Wurden PBMC mit CD3 mAk (UCHT-1, OKT3) stimuliert, waren drei Tage später noch 70% der Zellen vital. Der Anteil spät apoptotischer Zellen war mit den Kontrollen vergleichbar, wohingegen der Anteil der früh apoptotischen Zellen auf etwa 15% stieg. Wurden die Zellen zusätzlich zur CD3 mAk Stimulation noch mit dem CD28 Ko-Stimulus inkubiert, ließen sich nach drei Tagen nur noch etwa 55% vitale Zellen nachweisen. Der Anteil früh- und spät apoptotischer Zellen lag bei einer CD3/CD28 mAk Stimulation mit jeweils über 20% deutlich höher verglichen mit der Stimulation ohne Ko-Stimulus. Der Anteil der hierbei gemessenen vitalen Zellen sagt nichts über die Zellzahl in den einzelnen Ansätzen aus. Da CD3 und CD3/CD28 stimulierte Zellen proliferieren, sind in diesen Ansätzen insgesamt deutlich mehr Zellen vorhanden. Eine Stimulation mit α CD28 mAk ohne CD3 mAk hatte überdies keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen und war mit der Isotypkontrolle vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

3.7.1 Wann ist eine Ko-Stimulation CD3 mAk stimulierter Zellen notwendig?

Versuche in denen die Lagerung von isolierten PBMC getestet wurde, enthüllten eine wichtige Funktion des α CD28 Ko-Stimulus. Die in der vorliegenden Arbeit genutzten PBMC wurden zumeist frisch isoliert und direkt eingesetzt. Da teilweise Zellen an einem Versuchstag übrig blieben oder die Zellen zu späten Tageszeiten isoliert wurden (Buffy coats, Patientenproben), sollte getestet werden, ob eine Lagerung von isolierten Zellen einen Einfluss auf die T Zell Funktionen, besonders die *in vitro* Proliferation ausübt. Zu diesem Zweck wurde eine Stimulation frisch isolierter Zellen mit 24 h gelagerten Zellen verglichen. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei 4°C in Kühlschrank oder bei 37°C im Brutschrank.

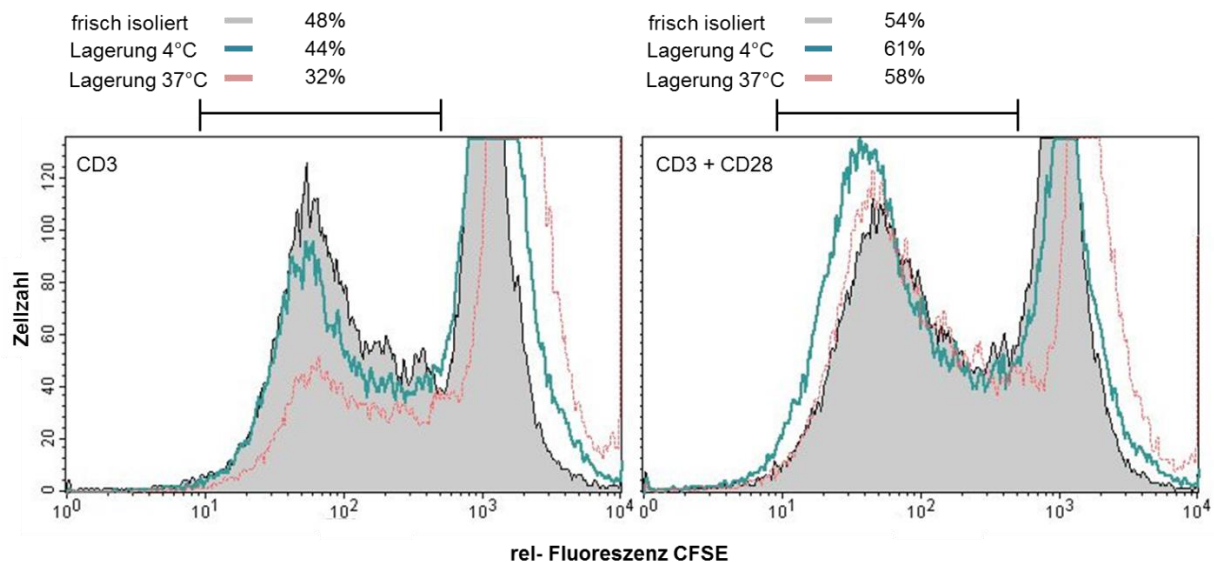


Abbildung 25 Für Proliferationsversuche eingesetzte PBMC können ohne funktionelle Einschränkungen zuvor über 24 h bei 4°C gelagert werden. PBMC wurden CFSE gefärbt, mit CD3/OKT3 mAk mit oder ohne α CD28 mAk stimuliert und nach vier Tagen durchflusszytometrisch gemessen. Gezeigt sind die CFSE Profile eines repräsentativen, gesunden Spenders für frisch isolierte Zellen (grau unterlegt) sowie PBMC die nach der Isolation für 24h bei 4°C (grüne Linie) oder 37°C (rote Linie) gelagert wurden. CD3/OKT3 zeigte eine verminderte mitogene Wirkung auf gelagerte PBMC, besonders bei einer Lagerung bei 37°C. Eine CD3/CD28 mAk Stimulation war auch bei gelagerten Zellen gleichbleibend. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch für CD3/UCHT-1 Responder (n=2).

In Abb. 25 ist die Proliferation nach einer viertägigen Stimulation mit CD3/OKT3 mAk bzw. der Kombination aus CD3/OKT3 mAk plus α CD28 mAk im CFSE Profil zu sehen. Es wären etwa drei bis vier Zellteilungen zu erwarten, wobei die einzelnen Zellteilungen nicht klar abgrenzbar sind (vgl. Abb. 5 CFSE Profil). Die Proliferationsprofile für frisch isolierte Zellen unterschieden sich zwischen dem CD3/OKT3 mAk Stimulus mit und ohne Ko-Stimulus nur geringfügig und zeigten eine leichte Proliferationssteigerung durch den α CD28 mAk Ko-Stimulus. Vergleicht man die Profile für die CD3/OKT3 mAk stimulierte Proliferation zwischen frisch isolierten und einem Tag gelagerten Zellen, weisen die gelagerten Zellen eine deutlich verminderte Proliferation auf. Dabei bezieht sich die Minderung geringfügig bis gar nicht auf die Anzahl der Zellteilungen sondern hauptsächlich auf die Menge der sich teilenden Zellen. Für eine eintägige Lagerung der Zellen bei 4°C im Kühlschrank war die Minderung der Proliferation nur gering. Für eine Lagerung der Zellen bei 37°C im Brutschrank (5% CO₂) hingegen, zeigte sich eine deutliche Minderung der Menge proliferierender Zellen von 48% bei frisch isolierten Zellen zu 32% für Zellen die bei 37°C gelagert wurden. Betrachtet man jedoch die Proliferationsprofile der verschiedenen Zellansätze für die CD3/OKT3 mAk plus α CD28 mAk Ko-Stimulation, ist kein Unterschied zwischen den Ansätzen zu erkennen. Vielmehr deutet sich sogar eine leichte Verstärkung der Proliferation für Zellen nach einer eintägigen Lagerung bei 4°C an.

Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass ein Ko-Stimulus seine Wirkung besonders dann entfalten kann, wenn der CD3 mAk Stimulus allein keine optimale bzw. maximale Proliferation auslöst. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des α CD28 mAk Ko-Stimulus in Kombination mit CD3 mAk Konzentrationen getestet, die allein nicht mitogen wirkten.

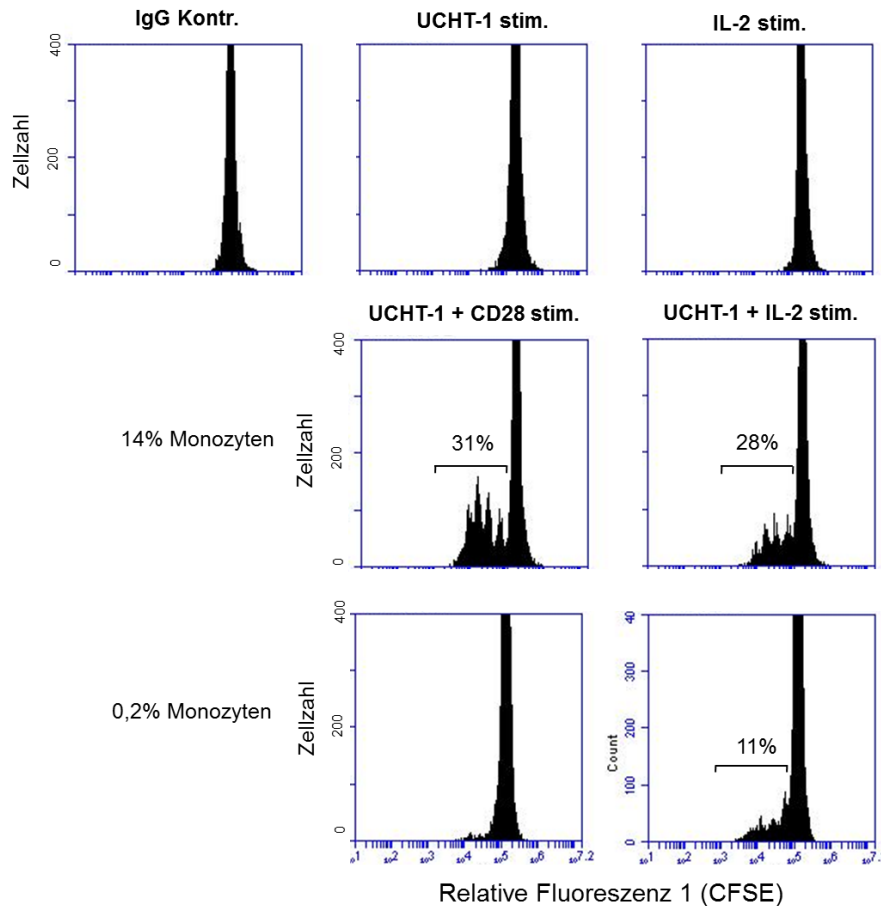


Abbildung 26 Nicht mitogene Konzentrationen von CD3 können in Kombination mit CD28 oder IL-2 eine Proliferation von T Zellen auslösen. Frisch isolierte Zellen eines gesunden, repräsentativen Responder wurden mit CFSE gefärbt und vier Tage mit CD3/UCHT-1 mAk (6 ng/ml), IL-2 (50 U/ml) oder einer Kombination aus CD3/UCHT-1 mAk und IL-2 bzw. CD3/UCHT-1 mAk und α CD28 mAk (1 μ g/ml) stimuliert. Die kombinatorischen Ansätze wurden mit üblichen sowie mit Monozyten reduzierten PBMC getestet. Die CFSE Profile zeigen, dass eine Proliferation der Zellen bei diesen CD3 Konzentrationen nur mit einem zusätzlichen Stimulus wie α CD28 mAk oder IL-2 möglich und zudem abhängig von Monozyten ist (n = 3).

In Abb. 26 sind die Profile von CFSE markierten Zellen eines Responder nach einer viertägigen Inkubation/Stimulation gezeigt. Inkubierte man die Zellen mit geringen Mengen CD3/UCHT-1 mAk (6 ng/ml) ließ sich, wie in der Isotypkontrolle, keine Proliferation auslösen. Auch eine Stimulation mit geringen Mengen IL-2 (50 U/ml) führte nicht zu einer Proliferation der Zellen. Kombinierte man allerdings die geringen Mengen CD3 mAk mit dem CD28 mAk Ko-Stimulus zeigte sich, dass sich etwa 30% der Zellen ein bis viermal teilten. Der Großteil dieser Zellen wies dabei zwei bis drei Zellteilungen auf. Reduziert man jedoch den Anteil der Monozyten in den untersuchten PBMC von ursprünglichen 14 % auf

0,2% ließ sich auch in Kombination mit dem Ko-Stimulus keine Proliferation der Zellen messen. Da es ohne Monozyten nicht zur Proliferation der Zellen kam und auch eine α CD28 mAk Stimulation allein nicht zur Proliferation von PBMC führte, bedeutet dies weiterhin, dass die CD3/UCHT-1 mAk Stimulation bereits ein Signal in den Zellen auslöst, welches erst durch eine Ko-Stimulation zur Proliferation der T Zellen führt. Wie in Abb. 26 zu sehen führt die Kombination von CD3/UCHT-1 mAk (6 ng/ml) und IL-2 (50 U/ml) ebenfalls zur Induktion von ein bis vier Zellteilungen von etwa 30% der PBMC. Hierbei zeigten die meisten dieser Zellen im Vergleich zur Stimulation mit CD3/UCHT-1 mAk und α CD28 mAk Ko-Stimulus allerdings nur ein bis zwei Zellteilungen. Auch in Monozyten-reduzierten Zellen teilten sich CD3/UCHT-1 mAk plus IL-2 stimulierte Zellen noch. Allerdings teilten sich hierbei nur 11% der Zellen in etwa drei Zellteilungen, mit dem Maximum der Zellen bei nur einer Zellteilung. Durch die Stimulation mit geringen Mengen CD3 mAk konnte keine CD25 Expression detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Daher kann eine Wirkung des IL-2 über den komplettierten IL-2 Rezeptor ausgeschlossen werden. Auch die Nutzung des Ko-Stimulus IL-2 anstelle von α CD28 mAk bestätigt, dass ein Ko-Stimulus besonders bei einer nicht maximalen CD3 mAk Stimulation notwendig ist.

3.7.2 Welche Wirkung haben Mikrovesikel auf die CD3 induzierte T Zell Proliferation?

Neben dem klassischen Ko-Stimulus α CD28 mAk wurden auch MV auf ihren ko-stimulierenden Einfluss hinsichtlich der CD3 mAk induzierte T Zell Stimulation untersucht.

Die genutzten MV wurden von Dr. Harrison Muturi isoliert, aufgereinigt und für die funktionellen Untersuchungen zur Verfügung gestellt (Muturi et al. 2013).

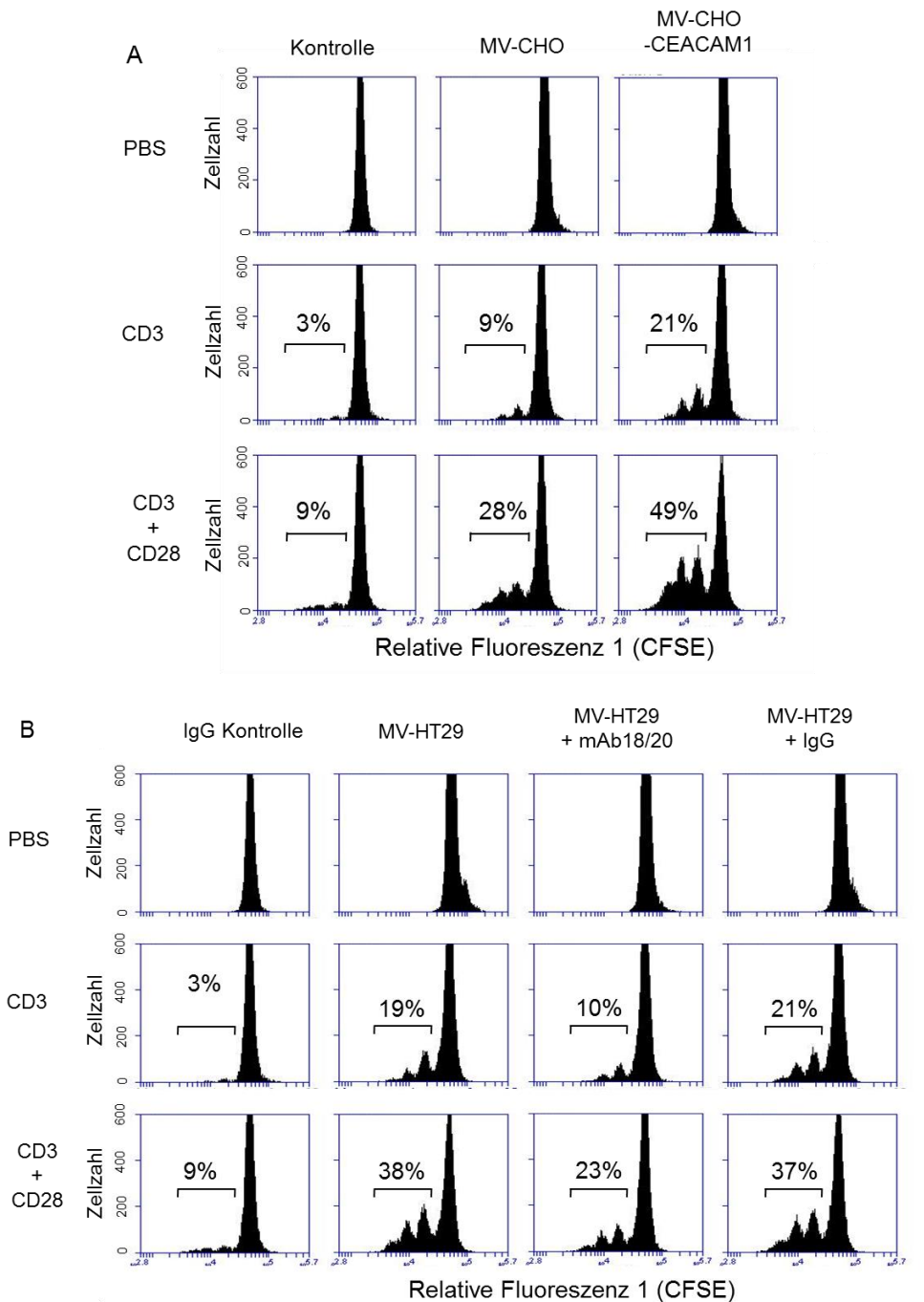


Abbildung 27 CEACAM tragende MV wirken ko-stimulatorisch auf eine CD3/CD28 Stimulation. Frisch isolierte PBMC eines gesunden, repräsentativen Responder wurden CFSE markiert und mit CD3/UCHT-1 mAk bzw. CD3/UCHT-1 mAk plus α CD28 mAk stimuliert. Die CFSE Proliferationsprofile wurden nach vier Tagen im Durchflusszytometer gemessen A) Ko-Inkubation der stimulierten Zellen mit CEACAM1 negativen und positiven MV von CHO Zellen/Transfektanten. B) Ko-Inkubation der stimulierten PBMC mit endogen CEACAM1 tragenden MV von HT29 Zellen mit und ohne den CEACAM1 inhibierenden Antikörper 18/20. CEACAM1 tragende MV wirken ko-stimulatorisch auf die CD3 Stimulation von T Zellen (Repräsentativer Responder, n=3).

In Abb. 27 sind Zellen eines Responder gezeigt, die nicht oder nur sehr schwach mit Proliferation auf einen CD3- oder CD3/CD28 mAk Stimulus reagieren. Um diese Situation zu erreichen wurde eine geringe Zellzahl in einem relativ großen Inkubationsvolumen stimuliert

(1×10^5 Zellen / 2,2ml), wodurch es ebenfalls zu einer CD3 mAk Konzentration von etwa 6 ng/ml kam. Eine Inkubation mit MV von CHO Zellen und CHO-CEACAM1 Transfektanten die CEACAM1 tragende MV abgeben, zeigte keinerlei mitogenen Effekt auf die PBMC von gesunden Spendern. Gab man MV von CHO Zellen zu den CD3/UCHT-1 mAk stimulierten Zellen, zeigte sich ein zwar marginaler, aber reproduzierbarer Effekt auf die Induktion der Proliferation von T Zellen. Handelte es sich allerdings um CEACAM1 tragende MV war der Effekt, mit 21% Zellen, die sich mehrfach geteilt hatten, mehr als doppelt so stark. Die proliferierten Zellen haben während der viertägigen Inkubation ein oder zwei Zellteilungen vollzogen. Eine Stimulation der Zellen mit CD3 mAk und α CD28 mAk zeigte unter diesen Kultivierungsbedingungen nur eine sehr moderate Proliferation von 9% der Zellen. Durch Ko-Inkubation mit MV konnten 30% der Zellen angeregt werden sich ein bis drei Mal zu teilen. Handelte es sich allerdings um CEACAM1 tragende MV waren fast 50% proliferierte Zellen nachzuweisen. Für diese MV unterstützte CD3/CD28 mAk Stimulation erkennt man in drei Zellteilungen während der viertägigen Inkubation (vgl. Abb 27A).

Um einen speziesspezifischen Effekt durch die MV der Hamsterzelllinie auszuschließen, wurden die Versuche mit MV der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 erweitert (Abb. 27 B). Der Effekt endogen CEACAM1 tragender MV von HT-29 Zellen auf die CD3 mAk und CD3/CD28 mAk Stimulation war vergleichbar mit dem zuvor beschriebenen Effekt der MV von CEACAM1 transfizierten CHO Zellen. Dabei teilten sich durch die CD3 mAk induzierte Proliferation 19% der Zellen. Bei der CD3/CD28 mAk Stimulation proliferierten nach einer viertägigen Inkubation 38% der Zellen. Wie zuvor für die CHO MV gezeigt, ließen sich zwei bis drei Zellteilungen nach dieser Inkubationszeit ausmachen. Um zu verifizieren, dass CEACAM1 auf MV entscheidend zur ko-stimulatorischen Wirkung der MV beiträgt, wurde mit dem CEACAM1 blockierenden Antikörper 18/20 gearbeitet. Die Bindung der CEACAM1 Moleküle führte zu einer verminderten Ko-Stimulation durch die HT-29 MV (Abb. 27 dritte Spalte). Der Anteil proliferierender Zellen sank dabei für eine CD3 mAk Stimulation etwa um die Hälfte auf 10% und für eine CD3/CD28 Stimulation von 38% auf 23%. Die so erhaltenen Werte entsprachen den Werten der Messung mit MV von CHO Zellen ohne CEACAM1. Die Inkubation mit HT-29 MV und einer Isotypkontrolle zeigte keine Veränderung des Anteils proliferierender Zellen nach einer viertägigen Inkubation (Abb. 27 vierte Spalte). Diese Versuche zeigen, dass CEACAM1 tragende MV unabhängig von ihrer Herkunft einen deutlichen ko-stimulatorischen Effekt auf die CD3 mAk und besonders die CD3/CD28 mAk Stimulation von T Zellen ausüben.

3.7.2.1 Wie werden Mikrovesikel isoliert?

Die von Herrn Dr. Muturi zur Verfügung gestellten MV wurden durch Mikrofiltration sowie Ultrazentrifugation gewonnen (Muturi et al. 2013). Diese Methode konnte in der Arbeitsgruppe weiter optimiert werden (Nilewski et al., in Bearbeitung). In ihrer Doktorarbeit konnte Frau Elena Nilewski zeigen, dass mit einer Mikrofiltration und anschließender Centricon® Zentrifugen Filtration aufgereinigte MV intakt und in ihrer Größe anders als in der Literatur beschrieben sehr homogen sind (vgl. 1.9). Im ZetaView wurden MV von humanen Prostatakarzinomzellen (PC-3) gemessen, welche durch Starvierung/Stress zur Produktion von MV angeregt wurden. In Nacharbeiten zu der erwähnten Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass auch die MV Abgabe anderer Zelltypen durch Starvierung der Zellen induziert werden kann. Neben den PC-3 Zellen wurden die epithelialen Kolonkarzinomzellen HT-29 sowie die Lungenkarzinomzellen A549 untersucht. Darüber hinaus wurde mit den AS-M.5 Zellen auch ein lymphendothelialer Zelltyp untersucht. Die Größe der MV war indes für alle gemessenen Zelltypen recht homogen und lag bei 150 nm +/- 20 nm. Mit Hilfe der leukämischen T Lymphozyten Zelllinie Jurkat sollten in der vorliegenden Arbeit auch die MV von Suspensionszellen untersucht werden. Weiterhin wurden frisch isolierte PBMC genutzt, um die MV von nicht immortalen Zellen zu analysieren. Für Immunzellen war eine Induktion von MV durch Starvierung nicht möglich, da die Zellen eine *in vitro* Kultivierung ohne Nährstoffe keine 24 h überlebten (Daten nicht gezeigt). Es stellte sich allerdings heraus, dass sowohl Jurkat Zellen als auch frisch isolierte PBMC konstitutiv MV abgeben.

Tabelle 14 MV Produktion wird durch CD3/UCHT-1 stimuliert (n=2)

Zellen	Kultivierung in Tagen	Ansätze	MV Größe in nm	Anzahl ⁸ MV x 10 ⁸
Jurkat	5	Kontrolle	155 +/-7	125
		CD3stim.	144 +/-5	200
Responder	3	Kontrolle	141 +/-10	23
		CD3stim.	154+/- 10	48
Non-Responder	3	Kontrolle	158+/- 6	22
		CD3stim.	164+/- 5	39

Auch die MV von diesen Zelltypen zeigten die von unserer Arbeitsgruppe beschriebene Größe von etwa 150 nm +/- 10 nm. Dabei konnten nach einer dreitägigen Kultivierung von PBMC (siehe 2.2.15.1) etwa zwei Milliarden MV isoliert werden. Eine Stimulation der Zellen

mit CD3/UCHT-1 mAk verdoppelte die Menge an MV sowohl für Zellen eines Responder als auch für Zellen eines Non-Responder. Nach einer fünftägigen Kultivierung von Jurkat Zellen konnten im Zellüberstand über 12 Milliarden MV detektiert werden. Auch für diese Zellen konnte ein CD3 Stimulus die Anzahl an MV im Zellüberstand in etwa verdoppeln (vgl. Tab. 14). Somit konnte gezeigt werden, dass auch eine Suspensionszelllinie sowie nicht immortalisierte Zellen MV mit einer Größe um 150 nm abgeben.

3.8 Warum sind CD3/OKT3 mAk stimulierte Zellen nicht re-stimulierbar?

In der vorangegangenen Masterarbeit wurde beschrieben, dass CD3/OKT3 mAk stimulierte Zellen nach einer dreitägigen Inkubation nicht ein weiteres Mal durch CD3 mAk (UCHT-1, OKT3) zur Stimulation angeregt werden können, also nicht re-stimulierbar sind. Die teilweise noch andauernde Proliferation wurde sogar durch Zugabe des CD3/UCHT-1 mAk reduziert. CD3/UCHT-1 mAk stimulierte Zellen hingegen konnten nach einer dreitägigen Stimulation durch weitere CD3 mAk (UCHT-1/OKT3) Gabe erneut stimuliert werden (Dreesen 2012).

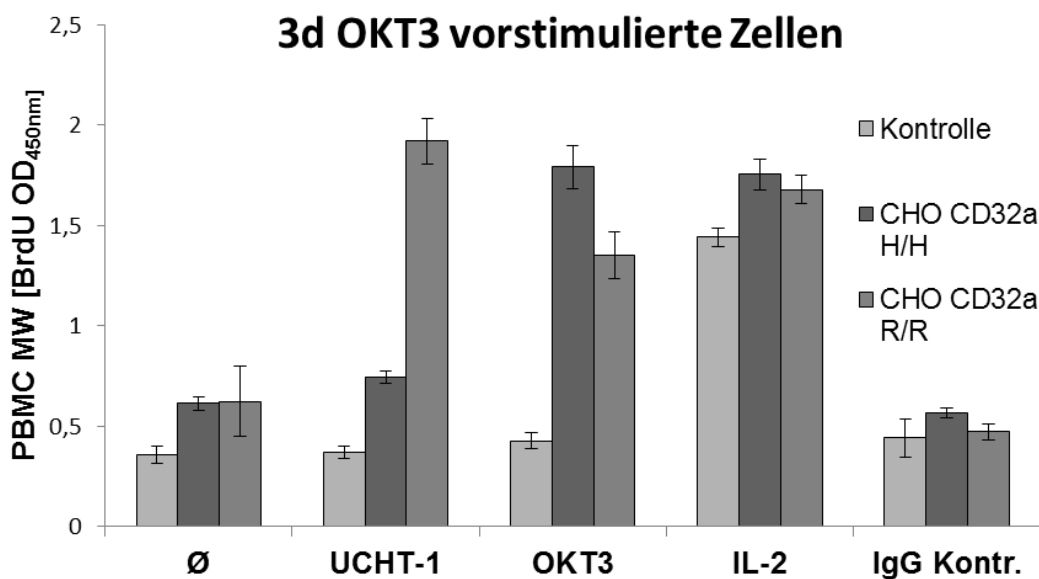


Abbildung 28 CD3/OKT3 vorstimulierte Zellen sind in Gegenwart von CD32a (R/R) exprimierenden Zellen re-stimulierbar. Inkubation frisch isolierter PBMC eines Non-Responder für drei Tage mit CD3/OKT mAk. Nach Trennung der toten Zellen durch Ficoll wurden die Zellen mit fixierten CHO Transfektanten mit dem CD32a H/H Rezeptor eines Non-Responder (mittlerer Balken) sowie CD32a R/R eines Responder (rechter Balken) ko-inkubiert. Die PBMC wurden mit CD3 (UCHT-1 und OKT3) stimuliert, zudem gab es zwei Negativ-Kontrollen: nur Medium (Ø) und eine Isotypkontrolle (IgG Kontr.) mit Be9.2 sowie eine Positiv-Kontrolle mit IL-2. Aufgetragen ist der Mittelwert (MW) der BrdU Messung bei OD_{450nm} für die verschiedenen Stimulationsansätze. Durch Ko-Inkubation mit CHO CD32a R/R Zellen können CD3/OKT3 mAk vorinkubierte Zellen erneut mit CD3 mAk zur Proliferation angeregt werden (Repräsentativer Spender, n=3).

Durch die Versuche zum Verbleib der Monozyten zeigte sich, dass eine CD3/OKT3 mAk induzierte Stimulation von PBMC zum Verlust aller Monozyten führt (vgl. 3. 5. 1.1). Da eine CD3/UCHT-1 mAk Behandlung von PBMC keinen kompletten Verlust der Monozyten nach sich zieht, stellte sich die Frage ob der Verlust der Monozyten und die Re-Stimulierbarkeit der Zellen in Zusammenhang stehen. Um die Aufgabe der fehlenden Monozyten zu ersetzen wurden Responder/Non-Responder Fcγ-Rezeptor-tragende CHO Zellen genutzt. Als Kontrollen wurden PBMC ohne zusätzliche CHO Zellen verwendet. Abbildung 28 veranschaulicht, dass zwischen diesen drei Ansätzen der CD3/OKT3 mAk vorstimulierten Zellen sowohl die Negativkontrollen (Zell-, Isotyp- Kontrolle) als auch die IL-2 Positivkontrolle vergleichbar sind. Eine Re-Stimulation der CD3/OKT3 mAk vorstimulierten Zellen konnte weder mit CD3/UCHT-1 mAk noch mit CD3/OKT3 mAk allein erreicht werden. Wurden die Zellen auf fixierten CHO Zellen, untransfiziert (Daten nicht gezeigt) oder mit Histidin-tragenden Fcγ-Rezeptoren, transfiziert (CHO CD32a H/H) inkubiert, gab es einen leichten Anstieg der Proliferation in allen Ansätzen. Eine signifikante Stimulation durch CD3/UCHT-1 mAk konnte bei dem in Abbildung 28 untersuchten Non-Responder erwartungsgemäß nicht detektiert werden. Durch die Stimulation mit CD3/OKT3 mAk hingegen kam es zu einer deutlichen Induktion der Proliferation. Fand die Kultivierung der Zellen auf fixierten CHO Zellen statt, die den Arginin-tragender Fcγ-Rezeptor exprimieren (CHO CD32a R/R) der sowohl Maus IgG1 als auch Maus IgG2 binden kann, konnte mit beiden CD3 mAk eine starke Proliferation ausgelöst werden. Die induzierte Proliferation war mit einer Stimulation drei Tage kultivierter, nicht vor-stimulierter Zellen vergleichbar (Abb.28).

Dies bedeutet, dass die Monozytenfunktion durch FcγIIa Rezeptor tragende CHO Zellen ersetzt werden kann. Demnach besteht zwischen einer CD3/UCHT-1 mAk und einer CD3/OKT3 mAk Stimulation von PBMC kein Unterschied in der Re-Stimulierbarkeit. Eine verminderte Re-Stimulierbarkeit bei CD3/OKT3 mAk vor-stimulierten Zellen ist lediglich auf den Verlust der Monozyten zurück zu führen.

3.9 Welchen Einfluss hat der Responder/Non-Responder Status bei Melanompatienten ?

Bei Melanompatienten konnten deutlich mehr Responder detektiert werden als bei den Kontrollprobanden. Daher wurden verschiedene klinische Parameter des Responder/Non-Responder Status in Kooperation mit PD Dr. Bastian Schilling statistisch analysiert.

	Responder	Non-Responder	p (X2-Test)
<u>Geschlecht</u>			
männlich	54%	57%	p=0,8
weiblich	46%	43%	
<u>Ulzeration</u>			
vorhanden	67%	44%	p=0,1
abwesend	33%	56%	
<u>BRAF Mutation</u>			
vorhanden	39%	65%	p= 0,054
abwesend	61%	35%	
<u>NRAS Mutation</u>			
vorhanden	40%	25%	p= 0,4
abwesend	60%	75%	

Ulzeration	Responder	Non-Responder	p (X2-Test)
<u>female</u>			
vorhanden	66%	40%	p=0,16
abwesend	34%	60%	
<u>male</u>			
vorhanden	68%	50%	p= 0,36
abwesend	32%	50%	

BRAF mut.	Responder	Non-Responder	p (X2-Test)
<u>female</u>			
vorhanden	44%	50%	p=0,73
abwesend	56%	50%	
<u>male</u>			
vorhanden	30%	100%	p< 0,01
abwesend	70%	0%	

Abbildung 29 Männliche Non-Responder mit Melanom tragen eine BRAF Mutation. Statistische Auswertung der Patientendaten bezüglich Geschlecht und dem Vorhandensein bzw. der Abwesenheit von Ulzerationen des Primärtumors sowie Mutationen in den Genen NRAS- und BRAF mittels Chi Quadrat Test. Zusätzlich differenzierte Auswertung des Chi Quadrat Tests von Ulzeration des Primärtumors und BRAF Mutation bezüglich des Geschlechts.

Mit Hilfe eines Chi Quadrat Tests wurde zunächst der Responder/Non-Responder Status der Melanompatienten im Hinblick auf Geschlecht, Ulzeration des Primärtumors sowie zweier mit Melanom assoziierten Genmutationen analysiert [BRAFFV600 und NRASQ61, vgl.(Bastian 2014)]. Dabei zeigte sich, dass die Verteilung von Respondern und Non-Respondern in männlichen und weiblichen Melanompatienten gleichverteilt ist. Für die Ulzeration des Primärtumors lässt sich ein Trend zu einer Erhöhung in Responder Individuen ablesen (Abb. 29). Eine detaillierte Analyse der Ulzeration in Bezug auf Geschlecht ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied. Eine Analyse der BRAF-V600 Mutation enthüllte eine deutliche Erhöhung dieser, wohingegen eine NRAS-Mutation keine Unterschiede zwischen Respondern und Non-Respondern aufwies. Eine BRAF-Mutation zeigte sich in 39% (22/57) der untersuchten Responder und in 65% (11/17) der untersuchten Non-Responder. Aufgeteilt nach Geschlecht stellte sich heraus, dass sich dieser Unterschied ausschließlich auf die Population männlicher Patienten bezieht. Während weibliche Responder und Non-Responder etwa gleich häufig eine BRAF-V600 Mutation aufwiesen, waren es in der männlichen Population nur 30% der Responder, aber alle (5/5) bis dato untersuchten Non-

Responder (vgl. Abb. 29). Somit wiesen die männliche Non-Responder der vorliegenden Studie, die ein Melanom entwickelt hatten, immer eine BRAF-V600 Mutation auf.

Ein weiterer Unterschied zwischen Respondern und Non-Respondern in Melanompatienten offenbart sich bei der Betrachtung des Patientenalters bei Erstdiagnose.

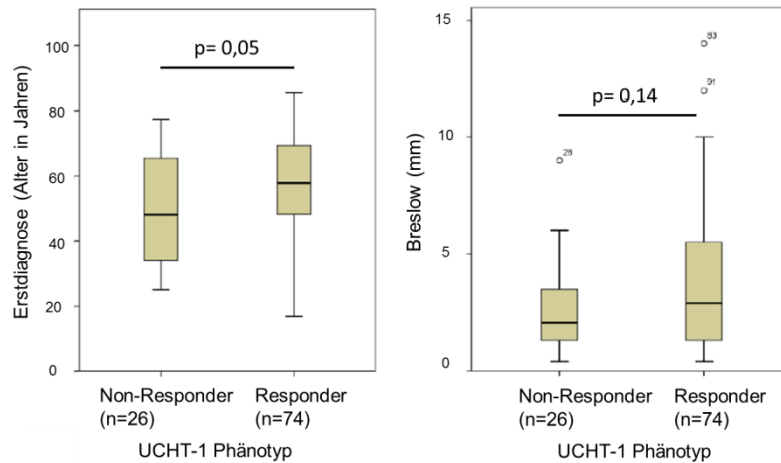


Abbildung 30 Non-Responder sind bei der Erstdiagnose eines Melanoms jünger als Responder. Gezeigt sind Kastengrafiken der untersuchten Respondern und Non-Respondern im Hinblick auf das Alter der Erstdiagnose in Jahren (links) und den Breslow-Index (rechts) in mm. P-Wert: Wilcoxon Test.

In Abbildung 30 ist zu erkennen, dass der Median des Alters bei Erstdiagnose für 26 untersuchte Non-Responder bei unter 50 Jahren liegt. Bei Respondern wird die Diagnose Melanom hingegen im Mittel über dem 50. Lebensjahr gestellt. Für die Analyse der Größe des Tumors mit Hilfe des Breslow Index ergab sich jedoch kein Unterschied zwischen Respondern und Non-Respondern. Daher wird ein Melanom in Non-Respondern trotz vergleichbarer Tumordicke bei Erstdiagnose in Respondern früher diagnostiziert.

Welchen Einfluss der Responder/Non-Responder Status auf das Metastase freie Überleben der Patienten hatte, wurde mit einer Kaplan-Meyer Analyse untersucht. Dabei wurde der Genotyp, nicht der Phänotyp des Responder/Non-Responder Status analysiert.

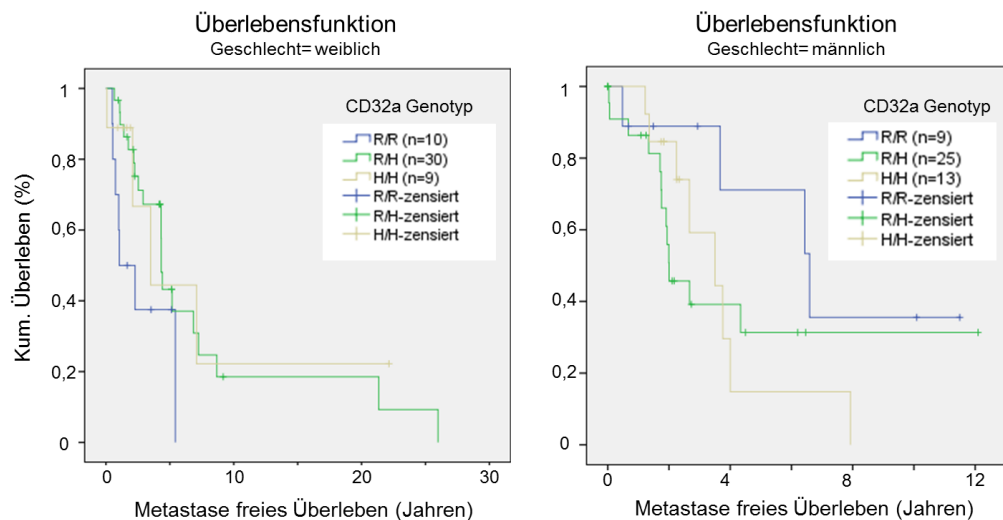


Abbildung 31 Das Metastasefreie Überleben von Melanompatienten ist für weibliche, homozygote Responder verkürzt. Kaplan-Meier-Kurve zum Metastasefreien überleben von männlichen sowie weiblichen Melanompatienten aufgeteilt nach Responder/Non-Responder Genotyp. R/R: homozygote Responder, R/H: heterozygote Responder, H/H: Non-Responder.

Abbildung 31 veranschaulicht das Metastase-freie Überleben in männlichen und weiblichen Melanompatienten. Für die zehn in dieser Studie analysierten weiblichen, homozygoten Responder (R/R) betrug das Metastase-freie Überleben lediglich fünf Jahre. Von den 30 heterozygoten Respondern und den neun Non-Respondern dieser Studie waren hingegen nach 20 Jahren noch 20% der Patientinnen metastasefrei. Für die männlichen Melanompatienten konnte das Metastase-freie Überleben lediglich über einen Zeitraum von 12 Jahren analysiert werden. Hierbei zeigte sich, im Gegensatz zu den Frauen, dass von den männlichen homozygoten Respondern nach zwölf Jahren noch fast 40% metastasefrei waren. Unter den heterozygoten Responder gab es nach 10 Jahren mit knapp 35% mehr metastasefreie Männer, als Frauen (20%). Die 20% bei den Frauen blieben allerdings bis zum 20. Jahr konstant, wobei dieser Zeitraum für Männer nicht analysiert werden konnte. Die 13 in dieser Analyse getesteten männlichen Non-Responder sind nur maximal acht Jahre metastasefrei und damit deutlich kürzer als weiblichen Non-Responder. Folglich zeigt sich ein Trend, dass bei Frauen homozygote Responder und bei Männern Non-Responder am schnellsten Metastasen entwickeln. Der Kurvenvergleich mittels log-Rank Test ergab für die CD32a Genotypen allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede für das Risiko Fernmetastasen zu entwickeln.

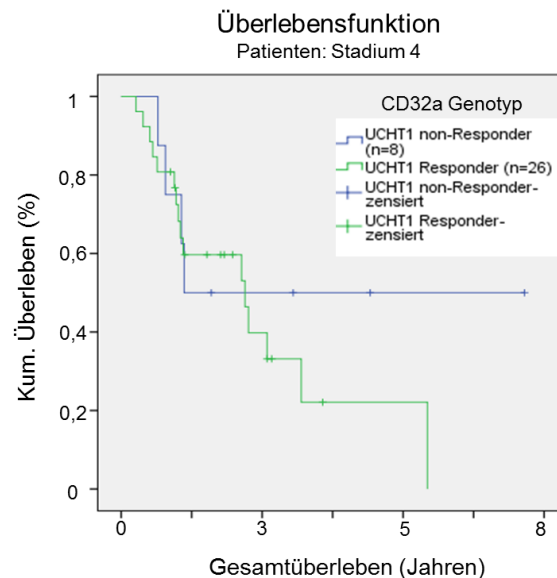


Abbildung 32 Non-Responder mit einem diagnostizierten Melanom in Stadium IV zeigen ein gesteigertes Gesamtüberleben. Kaplan-Meier-Kurve zum Gesamtüberleben von Responder (phänotypisch)- sowie Non-Responder Melanompatienten in Stadium IV.

Da Melanompatienten in Stadium IV die geringsten Heilungs- bzw. 5-Jahres Überlebenschancen haben, wurden diese Patienten bezüglich ihres Gesamtüberlebens analysiert. Dabei konnte ein Zeitraum von 8 Jahren ausgewertet werden. Während alle 26 Responder in einem Zeitraum von etwas mehr als 5 Jahren versterben, überlebten 50% der 8 untersuchten Non-Respondern noch mindestens 8 Jahre. Melanompatienten im Endstadium könnten demnach potentiell bessere Überlebenschancen haben, wenn sie Non-Responder sind. Auch hier ergab der Kurvenvergleich mittel log-Rank Test allerdings keine signifikanten Unterschiede.

4 Diskussion

4.1 CD3 Antikörper eignen sich nicht zur Simulation einer physiologischen T Zell Stimulation

In der vorliegenden Arbeit wurde die Stimulation von T Zellen mit zwei verschiedenen antiCD3 mAk untersucht. Diese monoklonalen Antikörper binden beide an die ϵ Untereinheit des CD3 Rezeptors, unterscheiden sich aber in ihrem Isotyp. Eine Stimulation mit CD3 mAk allein oder in Kombination mit einem Ko-Stimulus (meist CD28) ist eine etablierte Technik zur Stimulation von T Zellen *in vitro* (Kruisbeek et al. 2004). Dabei wird postuliert, dass diese Methode zur Nachahmung einer physiologischen TZR Aktivierung dient. Wie eine solche Stimulation auf molekularer Ebene funktioniert, wurde bis dato allerdings nicht im Detail beschrieben. Bereits der Umstand, dass ein CD3 mAk ohne Ko-Stimulus in der Lage ist Zellen zu aktivieren, widerspricht der gängigen Theorie einer physiologisch TZR Stimulation. Dabei besagt die Lehrbuchmeinung, dass ein T Lymphozyt der ein Antigen mit seinem TZR bindet, aber keine gleichzeitige Ko-Stimulation erfährt, in einen anergen Zustand übergeht. Er ist nun nicht mehr in der Lage auf weitere Stimuli zu reagieren (Murphy, Travers 2009). T Zellen als Subpopulation von PBMC hingegen, sind in der Lage auch in Abwesenheit eines Ko-Stimulus auf löslich zugefügte TZR bindende CD3 mAk zu reagieren. Dafür sind bereits sehr geringe Mengen (125 ng/ml) des CD3 mAk ausreichend (vgl. Abb. 7).

4.1.1 Die CD3 mAk induzierte T Lymphozyten Proliferation verändert das CD4/CD8 Verhältnis von PBMC zugunsten der CD8⁺ Zellen

Im physiologischen System wird T Zellen ein Antigen auf MHC Molekülen präsentiert. Dabei präsentieren APC CD4⁺ T Helferzellen ein Antigen auf MHCII Molekülen, wogegen die Präsentation auf MHCI Molekülen CD8⁺ T Killerzellen aktiviert (Murphy, Travers 2009). Mit einem CD3 mAk können anders als bei der MHC Präsentation beide T Zell Subtypen angesprochen werden. Da die beiden T Zell Subtypen prinzipiell unterschiedliche Funktionen ausüben, wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von CD3 mAk auf CD4⁺ sowie CD8⁺ T Zellen gesondert untersucht. Ein CD4/CD8 Verhältnis liegt üblicherweise bei 1,5 bis 2,5. Werte unter 1 stehen mit Viruserkrankungen wie HIV, Epstein-Barr und dem Zytomegalovirus in Verbindung und können ein Kennzeichen für Transplantationsabstoßungen oder eine Hämophilie sein (Gratama et al. 1986, Menitove et al.

1983). Die Messung der CD4⁺ und CD8⁺ T Lymphozyten drei Tage nach der Stimulation zeigte eine erhöhte Menge beider Subtypen. Dabei stellte sich für die CD4⁺ Zellen die Frage, welchen Einfluss an dieser Stelle die reinen Kultivierungsbedingungen haben. Eine Messung drei Tage kultivierter, nicht stimulierter Zellen ergab, dass bereits die Kultivierung ohne Stimulus die Anzahl CD4 positiver Zellen in den PBMC erhöht (vgl. Abb. 11). Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des CD4/CD8 Verhältnisses zu höheren Werten. Da es bei den Kontrollansätzen nie zu einer messbaren Proliferation kam, deutet dies auf ein sterben anderer Zellpopulationen innerhalb der PBMC hin. Darunter fallen auch, wie durch die Messung der toten Zellen in den Ansätzen gezeigt, die CD8⁺ T Lymphozyten. Eine zweite Möglichkeit ist, dass die Expression von CD4 Molekülen auf Monozyten (Filion et al. 1990) hochreguliert wird und diese CD4 tragenden Monozyten somit fälschlicherweise als T Helferzellen gezählt werden. Der Monozytenanteil in PBMC ist mit durchschnittlich 5-15% allerdings eher gering, zusätzlich adhären davon mehr als die Hälfte am Plattenboden und entwickeln sich später zu Makrophagen (vgl. Abb. 15) (Kelley et al. 1987). Für PBMC einzelner Probanden mit einem hohen Monozytenanteil könnte dies allerdings eine Erklärungsmöglichkeit sein. Die Messungen sechs Tage nach der CD3 mAk Stimulation sowie die CFSE Profile zeigten, dass der Anteil CD8⁺ Zellen weiter anstieg, wohingegen der Anteil CD4⁺ Lymphozyten sank. Auch die CFSE Proliferationsprofile zeigten innerhalb von vier Tagen häufigere Zellteilungen für CD8⁺ T Zellen. Die unterschiedlichen Proliferationsprofile von CD4 und CD8 positiven Zellen lassen sich durch verschiedene Hypothesen erklären. Zum einen könnten CD4 positive Zellen später beginnen zu proliferieren und zum anderen ist es denkbar, dass der CD3 mAk Stimulus nicht ausreicht um CD4⁺ Zellen über mehrere Zellteilungen hinweg zu stimulieren. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die CD4⁺ T Zellen beispielsweise durch die CD3 mAk induzierte Zytokinsekretion in die Differenzierung getrieben werden. CFSE Proliferationsprofile können hierbei keine Erklärung liefern, da erst nach drei bis vier Tagen Inkubation verlässliche und somit auswertbare Ergebnisse messbar sind. Auch eine Proliferationsdetektion mit BrdU ist für den ersten Tag nicht möglich. Ein BrdU Proliferationsassay drei Tage nach der CD3 mAk Stimulation wurde bereits im Zuge der Masterarbeit (Dreesen 2012) durchgeführt und gab Aufschluss darüber, ob sich die T Zell Subpopulationen gegenseitig bedingen, beispielsweise ob zunächst eine T Lymphozyten Subpopulation (z.B. T Helferzellen) stimuliert wird und diese wiederum die Stimulation der anderen Population auslöst. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene Zellansätze auf ihre Proliferation hin überprüft: PBMC, PBMC ohne CD4⁺ Lymphozyten und PBMC ohne CD8⁺ Lymphozyten. Es zeigte sich, dass die Proliferation nach drei Tagen in

allen Populationen vergleichbar war. Demnach proliferieren die T Zell Subpopulationen unabhängig voneinander. Weiterhin lässt sich daraus schließen, dass die Proliferation von CD4⁺ Zellen zu einem späteren Zeitpunkt einsetzt als die Proliferation der CD8⁺ Zellen. Da sich das CD4/CD8 Verhältnis allerdings nach sechs Tagen deutlich stärker zugunsten der CD8⁺ Zellen verschoben hat, scheint eine Kombination beider Erklärungsansätze zutreffend. Eine Proliferation durch CD3 mAk scheint in CD4⁺ T Lymphozyten im Vergleich zu CD8⁺ T Lymphozyten sowohl später einzusetzen als auch früher aufzuhören. Durch eine Zählung der CD4 sowie CD8 positiven T Zellen 12 h bis 72 h nach einer CD3 mAk Stimulation könnte die Frage, wann welche T Zell Subpopulation proliferiert, abschließend geklärt werden. Eine Proliferationsinduktion von CD8⁺ T Lymphozyten durch CD3 mAk (ohne CD28 Ko-Stimulus) konnte bereits im murinen System gezeigt werden (Wang et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde zudem gezeigt, dass eine CD3 mAk Stimulation mit löslichen Antikörpern auch im humanen System verstärkt einen Einfluss auf die Proliferationsinduktion CD8 positiver T Lymphozyten hat. Die Veränderung im CD4/CD8 Verhältnis durch die CD3 mAk Stimulation entspricht der im menschlichen Blut entstehenden Änderung bei Virusinfektionen, da infolgedessen ebenfalls CD8⁺ T Lymphozyten zur Proliferation angeregt werden (Gratama et al. 1986). Der Einsatz von CD3/CD28 Beads hingegen fördert fast ausschließlich die Proliferation CD4⁺ T Lymphozyten (Laux et al. 2000). Da durch die Beads, anders als durch die CD3 mAk, keine Monozyten an der Reaktion beteiligt sind, ist es vorstellbar, dass z.B. die Ausschüttung von Zytokinen seitens der Monozyten einen Einfluss bei der verstärkten Wirkung auf CD8⁺ T Lymphozyten hat. Bei dem Einsatz von CD3 mAk *in vitro* ist zu bedenken, dass ein verändertes CD4/CD8 Verhältnis aus bisher unbekannten Gründen, ein Hochrisikoprofil darstellt und mit einer verkürzten Lebensspanne in Verbindung gebracht wird (Ferguson et al. 1995).

4.1.2 Eine CD3 mAk Stimulation von PBMC führt zur Ausschüttung verschiedener Zytokine

Durch einen Zytokinarray war es möglich zu zeigen, dass eine PBMC Stimulation mit CD3 mAk die Ausschüttung von Zytokinen induziert. Mit dem genutzten Array konnten Zellüberstände qualitativ und quantitativ auf 13 Zytokine untersucht werden, die an einer T Zell Proliferation beteiligt sein können. Um einen ersten, groben Überblick über das Profil der Zytokinausschüttung einer CD3 mAk Stimulation in PBMC von Responder- und Non-Responder Individuen zu bekommen, wurde zunächst nur ein definierter Zeitpunkt

untersucht. Aufgrund der relativ unterschiedlichen Halbwertszeiten der untersuchten Zytokine, war es schwer einen optimalen Zeitpunkt für den Array zu wählen (Oliver et al. 1993). Der Zeitpunkt von 24 h wurde gewählt, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Proliferation stattgefunden hat, es aber 6-12 h später zur Synthese der DNA kommt, weshalb davon ausgegangen wurde, dass die Zytokinausschüttung bereits abgeschlossen ist. Zudem wird in der Labordiagnostik, beispielsweise bei der Überwachung einer immunsuppressiven Therapie eine Zytokinbestimmung 24 h nach einer T Zell Stimulation (Concanavalin A) durchgeführt (Kainzinger). Es konnte gezeigt werden, dass es durch eine CD3 mAk Stimulation mit OKT3 sowie mit UCHT-1 (für Responder) zu einer Ausschüttung von großen Mengen pro-inflammatorischer (TNF α , IL-1 β , IFN γ) und auch eines anti-inflammatorischen Zytokins (IL-10) kommt. In den meisten Fällen wurde auch das pro- sowie anti-inflammatorische IL-6 im Zellüberstand CD3 mAk stimulierter PBMC nachgewiesen. Diese Zytokine können von einem oder mehreren der folgenden Zelltypen: Monozyten, T- oder NK Zellen, produziert werden und wirken proliferativ auf T Zellen. Auffallend ist, dass bis auf IFN γ alle Zytokine von Monozyten produziert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Monozyten lediglich als Gerüst bei der CD3 mAk vermittelten T Zell Proliferation dienen und es auch in Abwesenheit von Monozyten zu einer Proliferation der T Zellen kommen kann (vgl. Abb. 14). Daher stellte sich die Frage welche der gemessenen Zytokine von Monozyten ausgeschüttet werden und daher potentiell nicht für die Proliferation notwendig sind.

IL-1 β kann zwar auch von NK Zellen produziert werden, wird aber fast hauptsächlich von Monozyten produziert (Ben-Sasson et al. 2009). Da die Monozyten nicht essentiell für die Proliferation sind, scheint der Einfluss des IL-1 β auf die CD3 mAk induzierte T Zell Proliferation unwahrscheinlich.

IL-6 ist als B Zell Wachstumsfaktor bekannt, es ist aber auch an der Proliferation von CD4⁺ T Zellen beteiligt (Dienz, Rincon 2009). Jedoch wirkt der proliferative Effekt durch IL-4, welches beim Zytokinarray der getesteten Überständen nicht nachgewiesen werden konnte. IL-6 wird zumeist von Monozyten ausgeschüttet. Im Gegensatz dazu können T Zellen IL-6 erst produzieren, wenn sie bereits zu Effektorzellen ausdifferenziert sind. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten PBMC handelt es sich allerdings um naive T Zellen, die kein IL-6 ausschütten. Da erneut nur Monozyten für die Produktion des Zytokins in Frage kommen, erscheint auch der Einfluss von IL-6 bei der CD3 mAk induzierten T Zell Proliferation unwahrscheinlich.

TNF α wird sowohl von Monozyten als auch von aktivierten T Lymphozyten produziert und spielt eine Rolle bei der Rekrutierung, Aktivierung und Proliferation von T Zellen *in vivo* und *in vitro* (Sata, Walsh 1998, McDevitt et al. 2002, Boyman et al. 2004). Somit scheint TNF α eine zentrale Rolle bei der CD3 mAk vermittelten T Zell Proliferation zu spielen.

IL-10 wird sowohl von Monozyten als auch von CD4⁺ T Zellen sezerniert und wirkt pro-proliferativ auf CD8⁺ T Zellen (Rowbottom et al. 1999). Da, wie im vorherigen Abschnitt diskutiert, CD8⁺ T Zellen durch den CD3 Stimulus stärker proliferieren als CD4⁺ T Zellen, scheint auch dieses Zytokin bei der an dieser Stelle untersuchten Proliferation eine entscheidende Rolle zu spielen.

IFN γ wird im Gegensatz zu den zuvor genannten Zytokinen nicht von Monozyten sondern von T- und NK Zellen produziert (Bach et al. 1997). Es hat einen positiven Effekt auf das Überleben und die Proliferation von CD4⁺ sowie CD8⁺ T Zellen (Reed et al. 2008, Whitmire et al. 2005) und ist dadurch wie IL-10 und TNF α potentiell entscheidend für die CD3 mAk induzierte T Zell Proliferation. Auffällig ist, dass es sich bei den fünf an dieser Stelle beschriebenen Zytokinen, abgesehen von IL-10, nur um pro-inflammatorische Zytokine handelt. Für die mitogene Wirkung von CD3 mAk scheinen TNF α , IFN γ und IL-10 potentiell verantwortlich zu sein. Dabei ist festzuhalten, dass diese Zytokine nicht in der Lage sind, allein zu einer Proliferation von T Zellen zu führen (Geginat et al. 2003) und daher nur in Kombination eine T Zell Proliferation induzieren können. Geginat und Kollegen konnten bereits zeigen, dass naive CD4⁺ T Lymphozyten durch eine Kombination der Zytokine IL-4, TNF α , IL-6 und IL-10 auch ohne weitere mitogene Stimuli zur Proliferation angeregt werden können. Abgesehen von IL-4 und eingeschränkt für IL-6 konnten diese Zytokine auch in der vorliegenden Arbeit nach CD3 mAk Stimulation von PBMC nachgewiesen werden. Geginat und Kollegen arbeiteten mit 25 ng/ml je Zytokin und konnten 72 h nach Zugabe dieser den Beginn der Proliferation naiver T Lymphozyten zeigen. In den Messungen der vorliegenden Arbeit lag die sekretierte Menge für diese Zytokine in allen Fällen unter 20 ng/ml. Trotzdem konnte bereits nach 48 h eine Proliferation gemessen werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Bindung von CD3 mAk nicht ausschließlich zur Ausschüttung von Zytokinen führt, sondern die Zelle auch anderweitig auf eine Proliferation vorbereitet und es somit schneller zu einer Proliferation kommt als ausschließlich durch Zytokine. Vorstellbar ist an dieser Stelle vor allem eine Vorbereitung der Zelle auf die zu erwartenden Zytokine. Dabei könnte die Expression eines Rezeptors hochreguliert werden oder eine Umstrukturierung bzw. Komplettierung von vorhandenen Rezeptoren, ähnlich wie es für den IL-2 Rezeptor gezeigt wurde (Dreesen 2011), stattfinden. Der dimere IL-2 Rezeptor wird durch die Expression der

α -Untereinheit CD25 zum Trimer komplettiert und kann so auf IL-2 reagieren. Der gering affine, konstitutive Teil des Rezeptors ist allerdings auch mit fehlender α -Untereinheit in der Lage auf IL-2 zu reagieren, wenn es in großen Mengen vorhanden ist (Gaffen 2001). Ähnlich scheint es auch für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Zytokine zu sein, die in hohen Konzentrationen, wie bei Geginat et al. gezeigt, ohne weiteren Stimulus mitogen wirken. Durch die Versuche mit verschiedenen Inkubationsvolumina (vgl. Abb. 7) wurde jedoch deutlich, dass eine Erhöhung des Inkubationsvolumens zu einer Abschwächung der Proliferation führt und diese sogar vollständig inhibieren kann. Dies könnte mit der Verringerung der Zytokinkonzentration aufgrund des größeren Volumens in Zusammenhang stehen. Daher ist davon auszugehen, dass die CD3 mAk direkt auf die T Zellen wirken, allerdings nur über die indirekte Wirkung mittels Zytokinen eine T Zell Proliferation auslösen können. Die Kombination aus aktueller Literatur, den Ergebnissen der Zytokinarrays und dem Resultat, dass eine CD3 mAk vermittelte T Zell Proliferation auch durch das Ersetzen der Gerüstfunktion von Monozyten und somit ohne Anwesenheit dieser stattfinden kann, führte zu dem Schluss, dass IFN γ , TNF α und IL-10 ausgeschüttet von Lymphozyten oder NK Zellen hauptverantwortlich für den mitogenen Effekt von CD3 mAk sind. Zur Überprüfung dieser Annahme, könnte eine Messung von Zytokinen hilfreich sein, die von PBMC ohne Monozyten ausgeschüttet werden. Zu diesem Zweck können eine Quervernetzung der TZR über CD3 mAk und α mIgG oder durch die CD32a tragenden CHO Transfektanten genutzt werden. Es ist weiterhin denkbar, dass in einem Zytokinprofil, welches keine Monozyten-Zytokine zeigt, andere Zytokine in den Fokus treten, welche jedoch aufgrund einer geringeren Expression in diesem Versuchsaufbau weniger Beachtung fanden.

Neben den zuvor beschriebenen Zytokinen fiel ein besonderes Augenmerk auf den Nachweis von IL-2. Für die Ausschüttung dieses Zytokins zeigte sich ein auffallender Unterschied im Vergleich der beiden untersuchten CD3 Stimuli. Eine CD3/OKT3 mAk Stimulation, nicht aber eine CD3/UCHT-1 mAk Stimulation, führte zur Ausschüttung dieses Botenstoffs. Dass CD3/UCHT-1 mAk stimulierte Zellen kein IL-2 ausschütten, wurde bereits 1984 von van Wauwe und Kollegen postuliert. Dabei wurde der Überstand CD3/UCHT-1- bzw. CD3/OKT3 mAk stimulierter Zellen mit Hilfe eines Radioimmunassays auf IL-2 untersucht. (Van Wauwe et al. 1984). Weiterhin zeigten van Wauwe und Kollegen, dass der mitogene Effekt von CD3/UCHT-1 mAk ohne eine durch den mAk bedingte Sekretion von IL-2 funktioniert, dieses für den mitogenen Effekt von CD3/OKT3 mAk allerdings notwendig ist. Die Autoren arbeiteten mit anti-Tac Antikörpern, die an die α Kette des IL-2 Rezeptors binden und diesen somit inhibieren sollen. Sie konnten so eine CD3/OKT3 mAk induzierte

Proliferation verhindern. In dieser Studie wurde allerdings vernachlässigt, dass wie zuvor erwähnt, eine Signaltransduktion durch die konstitutiv exprimierte β - und γ Kette des IL-2 Rezeptors möglich ist (Hakimi et al. 1993, Pilson et al. 1997), weshalb in den Versuchen der vorliegenden Arbeit auch IL-2 als positiv-Kontrolle gewählt wurde. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass für die Positivkontrolle mit 500 U/ml sehr hohe und nicht als physiologisch einzustufende Mengen IL-2 eingesetzt wurden. Weiterhin zeigte aber auch die Inhibition des ausgeschütteten IL-2 durch antiIL-2 Antikörper keinen Einfluss auf die Proliferation CD3/OKT3 mAk stimulierter Zellen (Dreesen 2012). Daher ist es fraglich, ob eine IL-2 Ausschüttung tatsächlich für eine CD3/OKT3 mAk vermittelte Proliferation notwendig ist. Abgesehen von dem Unterschied in der Ausschüttung von IL-2 zeigten Responder bei der Proliferationsantwort der Zellen auf CD3/UCHT-1 mAk verglichen mit der CD3/OKT3 mAk Stimulation keine signifikanten Unterschiede. Sie waren vergleichbar in Intensität, Dauer und Verlauf der induzierten Proliferation sowie in der Re-Stimulierbarkeit der Zellen. Folglich scheint IL-2 keinen direkten Einfluss auf die Induktion der T Zell Proliferation zu haben. Andere Veröffentlichungen schreiben IL-2 eher eine Funktion bei der Erhaltung und Homöostase von T Zellen als für die Proliferation dieser zu (Lantz et al. 2000). Dies könnte durch Langzeitmessungen der Proliferationsantwort validiert werden. Unklar ist noch der biologische Sinn aus dem die Zelle den Energieaufwand betreibt die α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors zu synthetisieren und zu exprimieren. Denkbar wäre, dass IL-15, welches ebenfalls über den IL-2 Rezeptor wirkt, in dieser Arbeit aber nicht Teil der Analyse war, einen Anteil an der Stimulationsinduktion hat (Ikemizu et al. 2012).

Obwohl eine CD3/OKT3 mAk Stimulation in Respondern und Non-Respondern zur T Zell Proliferation führte, zeigte sich ein Unterschied bei der Zytokinausschüttung. Zwar wurde in beiden Gruppen jeweils die gleiche Art von Zytokinen ausgeschüttet, allerdings in unterschiedlichen Quantitäten bezüglich IL-1 β , IL-10 und IFN γ . Ein Grund dafür könnte eine unterschiedliche Affinität von Responder und Non-Responder Fc γ Ila-Rezeptoren für murines IgG2 (CD3/OKT3) sein. Denkbar ist dies, da abgesehen von der selektiven Affinität für humanes IgG2 beide Rezeptortypen auch eine unterschiedlich starke Affinität für die anderen humanen IgGs aufweisen (Shashidharamurthy et al. 2009). Auch ein Unterschied in anderen Maus IgG2 bindenden Fc γ -Rezeptoren zwischen Respondern und Non-Respondern ist denkbar. Die vermehrte Ausschüttung von IL-10 in Non-Respondern wirkt inhibierend auf die IFN γ Produktion in T Lymphozyten wodurch dieses Zytokin verstärkt bei einer CD3/OKT3 Stimulation von Respondern gefunden wird. (Schroder et al. 2004). Da sich IFN γ und IL-10 gegenseitig beeinflussen ist es andererseits auch möglich, dass in Non-Respondern eine

verminderte IFN γ Ausschüttung zu einer vermehrten IL-10 Ausschüttung führt (Schaefer et al. 2009). In diesem Fall wären die Ergebnisse ein weiterer Hinweis für Unterschiede in Leukozyten von Respondern und Non-Respondern.

4.1.3 Eine α CD3 induzierte T Zell Proliferation wirkt nicht über die klassische TZR Signalkaskade

Untersuchungen zur TZR Signaltransduktion sollten zeigen, dass CD3 mAk auch ohne einen Ko-Stimulus eine T Zell Proliferation auslösen. Naheliegend war hierfür die Untersuchung der klassischen TZR Signaltransduktionskaskade. Da eine CD3 mAk Stimulation hierbei allerdings keine T-Phosphorylierung der zu Beginn der klassischen TZR Signalkaskade vorkommenden Proteine auslösen konnte, stellte sich die Frage welche Signaltransduktion tatsächlich durch einen solchen CD3 Stimulus ausgelöst wird. Eine Zap-70 T-Phosphorylierung wurde mit zwei unterschiedlichen Antikörpern untersucht. Der Antikörper der Firma Cell Signaling erkennt eine T-Phosphorylierung am Tyrosinrest 319. Diese Phosphorylierung wurde an Jurkat Zellen untersucht (Williams et al. 1999) und konnte auch in den Versuchen der vorliegenden Arbeit für Jurkat Zellen, allerdings nicht für PBMC nachgewiesen werden. Mit einem weiteren phosphoZap-70 Antikörper der Firma Millipore wurde eine Phosphorylierung des Tyrosinrestes 493 untersucht. Auch mit diesem Antikörper zeigte eine CD3 mAk Behandlung von PBMC lediglich für Jurkat Zellen eine Zap-70 T-Phosphorylierung. Obwohl eine Phosphorylierung des Tyrosinrestes 493 als ausreichend für die Zap-70 Aktivierung gilt, gibt es noch fünf weitere Tyrosinreste Y69,-129,-178,-292 und -492, an denen eine signalassoziierte Phosphorylierung und somit Aktivierung des Proteins stattfinden kann (Watts et al. 1994). Obwohl auch diese T-Phosphorylierungsstellen durch Versuche mit Jurkat Zellen nachgewiesen wurden, ist nicht auszuschließen, dass eine dieser Stellen in Zap-70 von CD3 mAk behandelten, primären T Zellen phosphoryliert und das Protein somit aktiviert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen mit den gleichen CD3 mAk Konzentrationen stimuliert wie innerhalb der Proliferationsassays oder mit Konzentrationen, die weit darüber lagen. Es wäre weiterhin möglich zu testen, ob es durch einen nicht optimalen Stimulus, also CD3 mAk Mengen, die keine Proliferation induzieren, zu einer T-Phosphorylierung von Zap-70 kommen kann. Bedenkt man allerdings, dass Zap-70 durch die Tyrosinkinase Lck phosphoryliert wird, welche mit dem Ko-Rezeptor CD4 oder CD8 assoziiert ist, erstaunt es nicht, dass eine CD3 Stimulation nicht zur Aktivierung von Zap-70 führt, da der Ko-Rezeptor

nur durch Bindung an das jeweilige MHC Molekül in räumliche Nähe zum TZR gebracht wird (Turner et al. 1990). Bei einer T Zell Stimulation mit CD3 mAk fehlt die bei der physiologischen Stimulation entstehende immunologische Synapse. Daher fehlen neben dem Ko-Rezeptor auch andere Moleküle, wie ko-stimulatorische Rezeptoren (CD40, CD86), Integrine und viele mehr. Daher ist es nicht verwunderlich, dass keines der zu Beginn der TZR Signalkaskade stehenden Moleküle (CD3 ξ -Kette, LAT), welche alle an der Zap-70 T-Phosphorylierung beteiligt sind, durch eine CD3 mAk Stimulation primärer T Zellen aktiviert werden konnten. Die in dieser Arbeit gezeigte konstitutive T-Phosphorylierung von Lck wurde bereits in naiven CD4⁺ Zellen nachgewiesen (Dong et al. 2010) und steht nicht in Zusammenhang mit dem dafür verwendeten CD3 mAk Stimulus.

Neben der T-Phosphorylierung von Zap-70 konnte auch ein intrazellulärer Kalziumanstieg durch einen CD3 mAk Stimulus nur für Jurkat Zellen, nicht aber für PBMC gezeigt werden. Trotz Reproduktion der in einer Veröffentlichung beschriebenen Protokolle zur Kalziummessungen, konnte in den Versuchen dieser Arbeit kein Kalziumausstoß in CD3 mAk stimulierten PBMC nachgewiesen werden (O'Flynn et al. 1985). O'Flynn und Kollegen nutzten für ihre Versuche zur Kalziummessung allerdings den Indikatorfarbstoff Quin2. Anders als der in den Versuchen dieser Arbeit genutzte Farbstoff Fura-2, kann Quin2 nur bei einer Wellenlänge angeregt werden. Somit konnten O'Flynn und Kollegen kein Verhältnis aus zwei gemessenen Wellenlängen hergestellt werden und die Kalziummessungen waren im Unterschied zur Nutzung von Fura-2 weniger sensitiv und aufgrund der Beladungs- und Zelltypabhängigkeit anfälliger für falsche Signale. Des Weiteren wurden für diese Veröffentlichung naive T Zellen genutzt, die durch Positivselektion gewonnen wurden. Dadurch ist eine Voraktivierung der Zellen wahrscheinlich. Um dies zu überprüfen nutzten wir eine Technik von Sugie und Kollegen. Dabei wurden die Zellen vor der Messung im Fluorospektrometer mit biotinyliertem CD3 mAk inkubiert. Während der Messung wurde den Zellen dann Streptavidin zugegeben, welches die CD3 mAk und somit die daran gebundenen TZRs quervernetzen sollte (Sugie et al. 2004). Sugie und Kollegen verwendeten diese Methode um den Kalziumanstieg in murinen CD4⁺ T Zellen zu zeigen, die aus Lymphknoten oder der Milz der Tiere isoliert wurden. Ein Effekt auf den Kalziumausstoß von PBMC konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings auch mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden. Ob es auch ohne Kalziumanstieg zur Aktivierung der kalziumabhängigen Phosphatase Calcineurin und anschließender Translokation von Transkriptionsfaktoren wie NFAT kommt (Hogan et al. 2003), bleibt zu untersuchen.

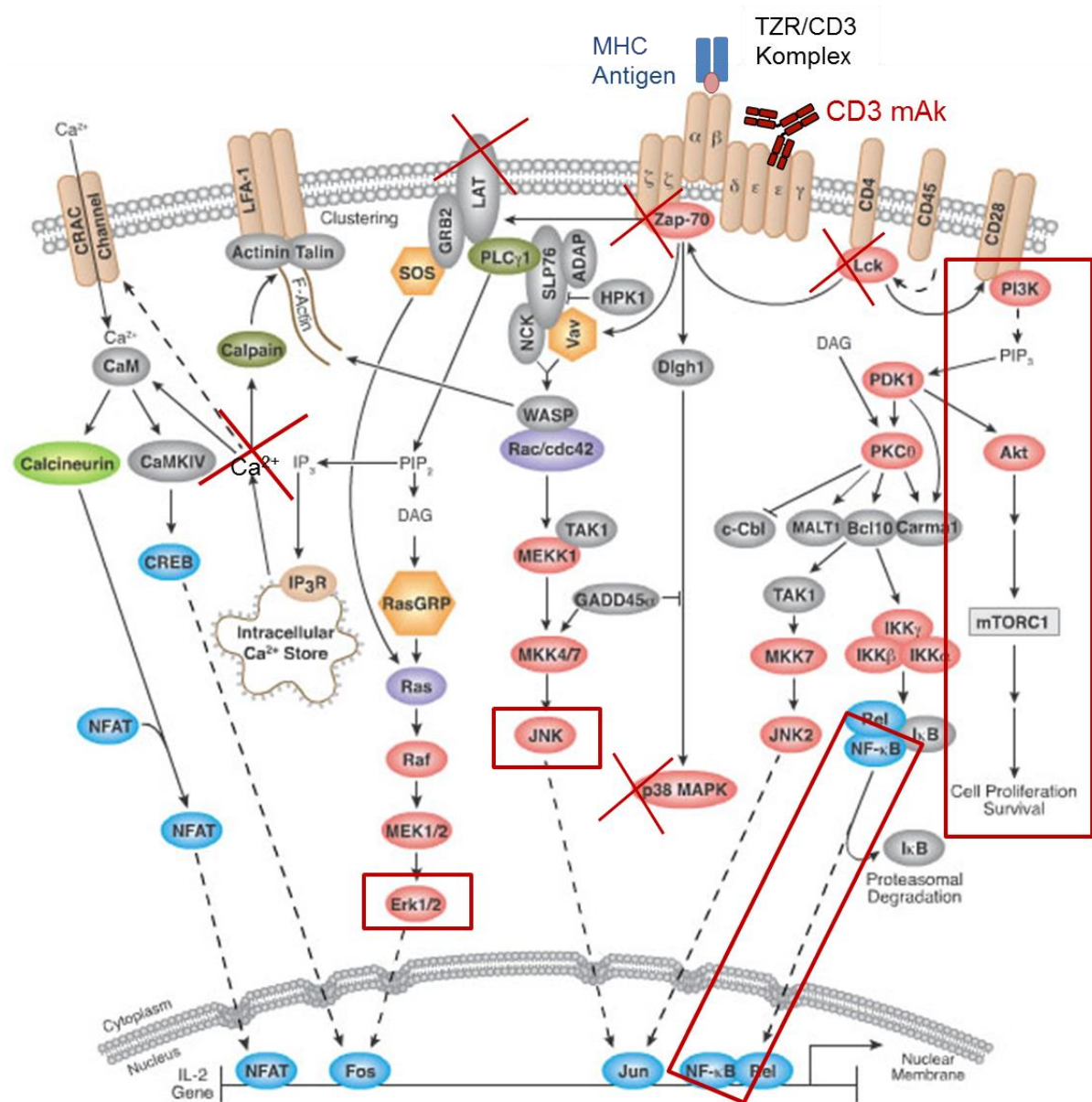


Abbildung 33 TZR Signalkaskade.

Modifiziert nach <http://www.homepages.ucl.ac.uk/~zcbtgn1/introduction.html>. Die Abbildung zeigt die von MHC präsentierte Antigenen ausgelöste TZR Signalkaskade. In rot ist ein CD3 mAk dargestellt. Dem entsprechend zeigen die roten Kästen, welche der untersuchten Signalmoleküle bei einer CD3 mAk Stimulation genutzt werden und die roten Kreuze kennzeichnen Moleküle, die anders als bei der physiologischen T Zelle Stimulation, nicht involviert sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Stimulation mit CD3 mAk in PBMC zu einem anderen Verlauf führt als in Jurkat Zellen und zum anderen nicht mit der physiologischen Aktivierung des TZR (MHC, CD28) vergleichbar ist. So fehlt bei einer CD3 mAk Stimulation von nativen PBMC die Aktivierung der zu Beginn der TZR Signalkaskade vorkommenden Moleküle. Der mittlere und am Ende liegende Teil der Kaskade scheint allerdings auch bei einer CD3 mAk induzierten T Zelle Proliferation beteiligt zu sein, da sowohl JNK als auch Erk durch den Stimulus aktiviert werden. Eine Inhibition von dem an dieser Signalkaskade

beteiligtem p38, zeigte keine Beeinträchtigung der CD3 mAk induzierten Proliferation. Allerdings ist p38 auch nicht direkt für die Zellproliferation sondern vielmehr für die Differenzierung von CD4⁺ Zellen notwendig (Rincon et al. 1998). Eine Beteiligung des PI3K/AKT Signalweges konnte ebenfalls durch die Nutzung von spezifischen Inhibitoren nachgewiesen werden. Dies lässt auch eine Beteiligung der Phospholipase C (PLC) vermuten (Koyasu 2003), was jedoch weiterer Untersuchungen bedarf. Auch eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors NFκB, der am Ende der TZR Signalkaskade steht, konnte in dieser Arbeit für die CD3 mAk Stimulation von PBMC gezeigt werden. Welche Signalmoleküle der T Zelle allerdings gleich zu Beginn der Stimulation und bis zur Aktivierung der MAPK Signalkaskade oder der NFκB Aktivierung benötigt werden, bleibt an dieser Stelle offen. Vorstellbar ist beispielsweise eine dem Toll Like Rezeptor (TLR) ähnliche Signaltransduktion, da auch diese zur Aktivierung von NFκB sowie einer Ausschüttung von Interleukinen wie IL-1β und IL-6 führt (Parker et al. 2007). Dies sind Effekte, die auch in dieser Arbeit gezeigt wurden.

Allgemein ist auffällig, dass viele Forschergruppen, die an der TZR Signalkaskade forschen mit der malignen, entarteten Leukämiezelllinie Jurkat arbeiten (Dong et al. 2006). Die Zelllinien bieten ein homogenes, leicht zu etablierendes und einfach zu modifizierendes System. Aufgrund der Homogenität der Zellen entfällt somit die in dieser Arbeit oft beschriebene Heterogenität in den verschiedenen Versuchsansätzen, durch die oft eine erhöhte Stichprobenzahl nötig war. Zudem entfällt eine aufwändige Isolierung von Primärzellen. Allerdings ist schon morphologisch ein gravierender Unterschied zwischen Jurkat Zellen und primären T Lymphozyten erkennbar, da Jurkat Zellen um ein vielfaches größer sind. Da Jurkat Zellen sich vom physiologischen Zustand einer T Zelle unterscheiden, ohnehin dauerhaft proliferieren und keine mitogene Steigerung durch T Zell Stimuli wie CD3 mAk erfahren können (Ledbetter et al. 1987), eignen sie sich nur bedingt für T Zell Studien.

Die in dieser Arbeit dokumentierten Unterschiede zwischen Jurkat Zellen und PBMC zeigen, wie wichtig es ist darauf zu achten, welche Zellen für die Untersuchung einer wissenschaftlichen Fragestellung verwendet werden. Veröffentlichungen, die mit naiven T Zellen arbeiten, nutzen häufig isolierte CD4⁺ T Zellen (Sugie et al. 2004, Dong et al. 2010). Da die in der vorliegenden Arbeit erlangten Ergebnisse aus Versuchen mit PBMC Zellen stammen, wurde auch nur diese Mischkultur hinsichtlich der TZR Signalkaskade untersucht. Zudem wurde nicht davon ausgegangen, dass die zusätzlich zu den T Zellen vorkommenden Zellen einen inhibierenden Effekt auf die Signalauslösung der T Zellen haben. Ganz im

Gegenteil wurde gezeigt, dass Monozyten sogar notwendig für die in der vorliegenden Arbeit untersuchte CD3 mAk induzierte Proliferation sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte veranschaulicht werden, dass eine CD3 Stimulation von PBMC nicht über die klassische TZR Signalkaskade zur T Zell Proliferation führt. Der MAPK Signalweg sowie der Transkriptionsfaktor NF κ B scheinen jedoch für die Proliferationsinduktion durch CD3 mAk notwendig zu sein. Um endgültig den Signalweg der CD3 mAk induzierten T Zell Stimulation zu identifizieren sind weitere, detaillierte Analysen von Signalprozessen notwendig.

4.1.4 Eine CD28 Ko-Stimulation zeigt ihre Wirkung bei einer nicht maximalen CD3 mAk Stimulation

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass CD3 mAk auch ohne zusätzlichen Ko-Stimulus in der Lage sind T Zellen zur Proliferation anzuregen. Dennoch stellte sich die Frage ob und wenn welchen Einfluss eine zusätzliche α CD28 Ko-Stimulation auf die CD3 mAk induzierte Proliferation von T Lymphozyten hat. Ein Ko-Stimulus ist definiert als Substanz, die allein keine Wirkung auf Zellen aufweist, aber in Synergie mit einem stimulierenden Signal (in dieser Arbeit CD3 mAk) zur maximalen Aktivierung der Zellen führt (Frauwirth, Thompson 2002). Darunter fallen der in der vorliegenden Arbeit untersuchte α CD28 mAk sowie MV. Es stellte sich heraus, dass der α CD28 Ko-Stimulus je nach Spender verschiedene Effekte zeigte. Für eine Ko-Inkubation mit CD3/UCHT-1 mAk konnte in über 50% der Fälle eine kostimulierende Wirkung des α CD28 mAk detektiert werden, wohingegen eine Wirkung auf CD3/OKT3 bei 60% der Probanden nicht ausgemacht werden konnte (vgl. Abb. 23). In Zusammenhang mit der Dosis-Wirkungskurve (vgl. Abb.7) und der Menge an ausgeschütteten Zytokinen (vgl. Abb. 8) deutet dies darauf hin, dass mAk des CD3 Klons OKT3 einen stärkeren mitogenen Effekt haben als CD3/UCHT-1 mAk.

Auch ein inhibierender Effekt der α CD28 mAk Ko-Inkubation auf die CD3 mAk induzierte Proliferation der Zellen einiger Probanden konnte beobachtet werden. Trotz der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten, sehr geringen Konzentrationen an CD3 mAk ist zu bedenken, dass ein CD3 Stimulus eine 1.000-10.000 fach höhere Affinität zum TZR hat als MHC Moleküle (Weber et al. 1992). Daher ist es denkbar, dass die Zellen in diesen Fällen durch den zusätzlichen α CD28 mAk Ko-Stimulus einer zu starken Stimulation unterlagen und daher in einen anergen oder apoptotischen Zustand übergingen. Da der Effekt sich etwa mit

doppelter Häufigkeit für CD3/OKT3 mAk zeigte, würde dies wiederum für eine generell stärkere Stimulation von CD3/OKT3 mAk im Gegensatz zu CD3/UCHT-1 mAk sprechen.

Eine Apoptose von T Zellen durch Hyperstimulation ist als Aktivierungs-Induzierter-Zelltod (AICD) bekannt und ist im physiologischen System notwendig um die periphere Immuntoleranz aufrecht zu erhalten (Kabelitz, Janssen 1997). AICD und Anergie, ausgelöst durch eine zu starke Stimulation mit CD3 mAk sind bereits für Konzentrationen von 5-10 µg/ml beschrieben worden (Kovacs et al. 1996). Welche Rolle ein αCD28 mAk Ko-Stimulus in diesem Zusammenhang spielt, ist allerdings umstritten, da sowohl ein Schutz als auch eine Verstärkung von AICD postuliert wurden (Boussiotis et al. 1997, Walsh, O'Connor 2000). Da AICD durch Fas und Fas-Ligand Interaktion ausgelöst wird, könnte eine Untersuchung des Fas Rezeptors auf T Zellen für Zellen, die stärker durch CD3 mAk als durch CD3/CD28 proliferieren in diesem Fall Klarheit schaffen. Da auch eine CD3 mAk induzierte Apoptose durch Mitochondrien (Apoptose II) postuliert wurde, wäre weiterhin eine Analyse der Caspase 9 Aktivität denkbar (Tang et al. 2003). Die Daten zur Apoptosemessung der Stimulationsansätze verdeutlichen, dass eine CD3 mAk Stimulation tatsächlich mit einer erhöhten Apoptose einhergeht. Anders als in der Literatur beschrieben verstärkt ein zusätzlicher αCD28 mAk Ko-Stimulus diesen Effekt (Radvanyi et al. 1996). Das vermehrte sterben von Zellen könnte daran liegen, dass besonders Zellen, die nicht zur Proliferation angeregt werden können, in Apoptose übergehen und/oder dass sich durch die starken Zellteilungen ein Nährstoffmangel im Kulturmedium bzw. eine erniedrigter pH Wert im Medium ergibt. Boise und Kollegen konnten zeigen, dass ein αCD28 mAk Ko-Stimulus nicht direkt die Apoptose verhindert, aber über einen längeren Zeitraum (> 7 Tage) das T Zell Überleben zu sichern scheint (Boise et al. 2010). Um dies zu bestätigen wäre es notwendig Langzeitanalysen zum Überleben der Zellen durchzuführen, da in der vorliegenden Arbeit mit drei Tagen nur ein relativ kurzer Zeitpunkt analysiert wurde.

Welch ein pro-proliferatives Potential ein αCD28 mAk Ko-Stimulus hat, zeigte sich in Versuchen über die Lagerbarkeit der isolierten PBMC. Neben der Beantwortung der Fragestellung, dass PBMC über Nacht bei 4°C gelagert und anschließend zur Proliferation angeregt werden können, zeigte sich noch ein unerwarteter Effekt des Ko-Stimulus. Auch unter anderen Lagerbedingungen (37°C, ü.N.) konnte eine CD3/CD28 mAk Stimulation, anders als eine CD3 mAk Stimulation, eine mit der Kontrolle vergleichbare T Zell Proliferation auslösen. Dies führte zu der Hypothese, dass der Ko-Stimulus besonders dann notwendig ist, wenn die CD3 mAk Stimulation nicht ausreichend ist um eine Proliferation zu induzieren. Die Hypothese konnte jedoch nur in Anwesenheit von Monozyten bestätigt

werden (vgl. Abb. 26). Das lässt darauf schließen, dass der α CD28 mAk, der wie CD3/UCHT-1 ein muriner IgG1 mAk ist, die Monozyten in die direkte Nähe der Zellen bringt und so eine Quervernetzung des TZR bewirken kann oder generell die Signalgebenden Moleküle in räumliche Nähe bringt und so das Signal innerhalb der Zelle verstärkt (Michel et al. 2001). Ein ähnlicher Effekt zeigt sich allerdings auch, wenn ein allein unzureichender CD3 mAk Stimulus mit der Gabe von IL-2 kombiniert wird. IL-2 kann nicht als klassischer Ko-Stimulus betrachtet werden, da es in hohen Konzentrationen auch allein mitogen auf T Zellen wirkt. Die Nutzung von geringen Mengen IL-2 bei der Kultivierung von Lymphozyten wird oft genutzt und dient der Lebenserhaltung der Zellen (Lichtenfels et al. 2012). Der Effekt der Kombination von CD3 mAk und IL-2 ist allerdings vermindert, wenn die stimulierten PBMC keine Monozyten enthalten. Möglicherweise übt die Bindung der Fc γ -Rezeptoren an Monozyten einen verstärkenden Effekt auf die PBMC Proliferation aus. Ein Grund dafür könnte die Ausschüttung von Zytokinen wie beispielsweise TNF α seitens der Monozyten sein (Wijngaarden et al. 2004).

Da der in der vorliegenden Arbeit genutzte α CD28 mAk wie CD3/UCHT-1 ein muriner IgG1 mAk ist, erscheint für Non-Responder ein Quervernetzen oder Näherbringen der Signalkomponenten durch den CD28 Rezeptor unwahrscheinlich. Dennoch konnten die Zellen von 18% der Non-Responder, die nicht auf einen CD3/UCHT-1 Stimulus reagierten, durch eine Kombination mit α CD28 mAk zur Proliferation angeregt werden. Es ist zu vermuten, dass bereits die Bindung des CD3 mAk, auch ohne Quervernetzung durch Fc γ -Rezeptoren auf Monozyten, zu einer Signaltransduktion in den Zellen führt. Diese Signaltransduktion hat allerdings weder die Expression von Aktivierungsmarkern (Dreesen 2011) noch eine Proliferation der Zellen zur Folge. Für 18% der Non-Responder scheint ein α CD28 mAk Ko-Stimulus jedoch ausreichend um die Signaltransduktion soweit zu verstärken, dass die Zellen proliferieren. Es wurde beschrieben, dass ein Ko-Stimulus über CD28 zur Ausschüttung von IL-2 führen kann oder das Fortschreiten des Zellzyklus beschleunigt (Thompson et al. 1989, Appleman et al. 2000). Ungeklärt ist, warum nur die Zellen von 18% der Non-Responder durch einen zusätzlichen α CD28 Ko-Stimulus proliferieren können. Die T Lymphozyten dieser CD3/UCHT-1/CD28 Responder scheinen in gewisser Weise vorbereitet, d.h. „geprimt“ zu sein. Durch das Priming wird die Sensibilität der Zelle für stimulierende Signalen erhöht. Im Zuge dessen kann es beispielsweise zu einer Synthetisierung und Lagerung von Zytokinen oder anderer, an der Zellaktivierung beteiligter Proteinen kommen. Zellen könnten durch verschiedenste Einflüsse „geprimt“ sein. Denkbar sind unerkannte (vorangegangene) Erkrankungen, die Virenbelastung eines Individuums mit

beispielsweise Herpesviren, aber auch Vorinfektionen durch Krankheiten, die noch nicht ausgebrochen sind. Andererseits ist auch ein Einfluss des Lebenswandels, etwa Ess- oder Sportgewohnheiten, sowie ein Einfluss der Umwelt vorstellbar. Ein Unterschied zwischen den Geschlechtern konnte nicht festgestellt werden. Ob der CD3/UCHT-1/CD28 Responder Status ein permanenter Status ist oder sich beispielsweise aufgrund von hormonellen Änderungen oder dem allgemeinen Gesundheitszustand ändert, erfordert die Analyse einer Vielzahl weiterer Probanden.

4.1.4.1 Tumorgenerierte MV und CEACAM1 wirken als Ko-Stimulatoren bei der T Zell Proliferation

Ein völlig anderer Ansatz zur Ko-Stimulation von T Lymphozyten war der Einsatz von MV. Für die Wirkung von MV auf die Stimulation von Immunzellen sind sowohl kostimulatorische als auch inhibitorische Effekte beschrieben worden (Holder et al. 2012, Muralidharan-Chari et al. 2010). Auch die Rolle von CEACAM1 bei der Immunmodulation wird kontrovers diskutiert und liefert sowohl Belege für eine Verstärkung als auch eine Inhibition durch den homophilen Adhäsionsrezeptor CEACAM1 (Kammerer et al. 1998, Gray-Owen, Blumberg 2006). Erst kürzlich wurde zudem beschrieben, dass MV die von nativ CEACAM1 exprimierenden Zellen stammen, ebenfalls CEACAM1 Moleküle tragen (Muturi et al. 2013). Durch die Nutzung CEACAM-tragender Vesikel, konnte nun auch die Wirkung membrangebundener CEACAMs auf T Zellen untersucht werden. In Vorarbeiten zur Doktorarbeit wurde bereits die Wirkung von tumorgenerierten MV mit und ohne CEACAM1 in Kombination mit einer CD3 mAk Stimulation von PBMC untersucht. Auch an dieser Stelle zeigten sich ko-stimulatorische und inhibitorische Effekte, sowohl inter- also auch intraindividuell (Dreesen 2011).

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde daher der Ansatz der CD3 mAk Stimulation verändert. Um einen potentiell ko-stimulatorischen Effekt der CEACAM1 positiven MV bei der T Zell Proliferation zu testen, wurden die Bedingungen für den CD3 mAk Stimulus so gewählt, dass er allein noch nicht zu einer Proliferation der T Zellen führte. Um auch die Wirkung einer in vielen Laboren verwendeten CD3/CD28 Stimulation unter diesen Bedingungen zu testen, wurde an dieser Stelle der Versuchsaufbau so gestaltet, dass die Antikörper in einem gegenüber dem regulären Versuchsaufbau großen Volumen zu den Zellen gegeben wurden. Dadurch konnte auch die Proliferationsantwort der Zellen auf einen CD3/CD28 Stimulus minimiert werden. Es zeigte sich, dass bei diesem Versuchsaufbau MV

und in höherem Ausmaß CEACAM1 tragende MV einen ko-stimulierenden Effekt auf die CD3/CD28 induzierte Proliferation von T Zellen ausübten. Dieser CEACAM1 vermittelte Effekt konnte durch CEACAM1 blockierende mAk unterbunden werden. CEACAM1 negative MV zeigten bei der CD3 mAk Stimulation einen ähnlichen, wenn auch deutlich geringeren ko-stimulatorischen Effekt auf T Lymphozyten. Anders als bei einer mitogenen CD3 mAk Konzentration sowie einer CD28 Ko-Stimulation (vgl. Abb. 5, Abb. 27), zeigten sich für MV mit sowie ohne CEACAM1 innerhalb von vier Tagen nur drei anstelle von vier Zellteilungen. Hierfür könnten eine Verzögerung des Proliferationsbeginns sowie eine kürzere Dauer der Stimulation aufgrund eines Proliferationsstops durch T Zell Differenzierungen ursächlich sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass lediglich CD4⁺ T Lymphozyten auf eine Ko-Stimulation mit MV/CEACAM1 ansprechen, da auch mit einer mitogenen CD3 mAk Konzentration nach vier Tagen nur drei anstelle von vier Zellteilungen beobachtet wurden (vgl. Abb. 5).

Bezüglich der Wirkung von CEACAM1 ist zu beachten, dass bei der malignen Entartung von Zellen die Expression dieses Moleküls oftmals sinkt (Obrink 2008). Es ist daher vorstellbar, dass die Tumorzellen CEACAM1 Moleküle auf der Oberfläche reduzieren, indem es in Form von MV von der Plasmamembran abgeschnürt wird. Weiterhin könnten sich diese MV durch den Transport in Körperflüssigkeiten vom Tumor entfernen und so das Immunsystem von den malignen Zellen ablenken. Diese Daten stehen im Gegensatz zu Beschreibungen zur Freisetzung von immunsuppressiven Exosomen (Clayton, Mason 2009). Bei MV handelt es sich allerdings anders als bei Exosomen um Abschnürungen der Plasmamembran.

PD Dr. Bernhard B. Singer konnte eine neue Methode zur Isolation von MV entwickeln (Nilewski et al., in Bearbeitung). Diese Methode kommt ohne eine Ultrazentrifugation der Vesikel aus und zeigt, dass MV anders als bisher beschrieben eine homogene Größe von 150 +/- 20 nm aufweisen. Durch den Druck und die mechanische Belastung in der Ultrazentrifuge kann es zur Fusion der Vesikeln sowie zu einer Beschädigung der Membran und somit zum Austritt des Vesikelinhaltes kommen. Durch die Substitution dieses Zentrifugationsschrittes zeigt sich daher, dass die Größe von MV nicht zufällig ist. Die homogene Größe könnte etwa mit den Fließeigenschaften der MV im Blut zusammenhängen oder ein optimales Volumen zu Größe Verhältnis darstellen. Die einheitliche Größe wurde für MV von Zelllinien der verschiedenrer adhärenter, muriner sowie humaner Zelltypen (CHO, HAT-29, Balb/c uvm.) bestätigt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch die MV von Immunzellen diese Größe aufweisen. Damit konnte die homogene Größe der MV auch für Suspensionszellen sowie nicht-maligne Zellen bestätigt werden. Eine erhöhte MV

Freisetzung durch Nahrungsentzug (Muturi et al. 2013) war bei den Immunzellen jedoch nicht möglich, da diese durch einen Mangel an Serumproteinen, nicht überlebensfähig waren. Es zeigte sich jedoch, dass eine Stimulation der Zellen mit CD3 mAk zu einer erhöhten Produktion von MV führte. Da Jurkat Zellen, die durch ihre Immortalität stetigen Zellteilungen unterliegen und durch den CD3 mAk Stimulus nicht zu einer gesteigerten Proliferation gebracht werden können, scheint dieser Effekt nicht an der durch CD3 mAk erhöhten Zellzahl zu liegen. Viel eher ist zu vermuten, dass eine durch CD3 mAk angeregte Signaltransduktion im Zytoplasma der Zelle zu dieser vermehrten Abgabe von MV führt.

4.2 Der Responder/Non-Responder Status wird durch einen Polymorphismus im CD32a Gen genetisch determiniert

4.2.1 Der Anteil weiblicher Responder ist in gesunden Probanden vermindert

Anknüpfend an die vorangegangene Masterarbeit wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit Blutspender aufgrund der Stimulierbarkeit ihrer Leukozyten durch CD3/UCHT-1 mAk in Responder und Non-Responder unterteilt. Der Stichprobenumfang wurde dabei in dieser Arbeit verdreifacht (32 zu 100). Somit konnte eine Teststärke von 85% erreicht werden (vgl.2.2.20). Wie wichtig eine ausreichende Teststärke ist, zeigte sich, da der Anteil an Respondern in der Population der Kontrollprobanden im Vergleich zur Masterarbeit von 41% auf 60% anstieg. Die Erhöhung des Responderanteils war dabei auf beide Geschlechter verteilt. In der weiblichen Population stieg der Anteil von 24% auf 44% und in der männlichen Population von 44% auf 76%. Damit blieb die zuvor beobachtete Tendenz von etwa 1,8x mehr Respondern bei Männern bestehen. Bei der erstmaligen Beschreibung eines CD3/UCHT-1 Responder Status 1984 durch van Wauwe und Kollegen wurden lediglich 40 Testpersonen untersucht. Mit dem Ergebnis von allgemein 63% Respondern, darunter 80% in der männlichen Population und 45% in der weiblichen Population liegen diese Werte damit äußerst nah an den in der vorliegenden Arbeit beobachteten Werten (Van Wauwe et al. 1984).

4.2.2 Monozyten dienen als Gerüst zum TZR Clustering

Die Frage warum Personen in UCHT-1 Responder oder Non-Responder unterteilt werden können, stellten sich bereits Wissenschaftler in den 1980er Jahren. Diese Frage konnte allerdings durch den damaligen Wissensstand und den Mangel an technischen Möglichkeiten

nicht abschließend geklärt werden. Die Erstbeschreibung des Responder/Non-Responder-Status erfolgte im März 1984 (Van Wauwe et al. 1984). Bereits im gleichen Jahr wurde als möglicher Erklärungsansatz die Monozytenhypothese aufgestellt. Diese besagt, dass die CD3 mAk nicht nur mit dem FAB-Fragment an das CD3 Molekül auf der T Zelle, sondern gleichzeitig auch mit dem Fc-Teil (IgG) an den Fc γ -Rezeptor von Monozyten binden müssen. Sowohl CD3/OKT3, der bei den Zellen aller Spender mitogen wirkt, als auch CD3/UCHT-1, der nur auf die Zellen von Respondern mitogen wirkt, sind monoklonale Antikörper aus dem Wirt Maus, die an überlappende Epitope der ϵ Untereinheit des CD3 Moleküls binden. Sie unterscheiden sich allerdings in der Hinsicht, dass es sich bei CD3/OKT3 um einen IgG2a Antikörper und bei CD3/UCHT-1 um einen IgG1 Antikörper handelt. Daher wurde davon ausgegangen, dass Non-Responder keine Fc γ -Rezeptoren für murines IgG1 besitzen (Tax et al. 1984, Smith et al. 1986). Um diese Hypothese zu überprüfen wurde in der vorangegangenen Masterarbeit zunächst mit der Eliminierung von Monozyten experimentiert. Zu diesem Zweck wurde der Monozytenanteil, der bei der Proliferation getesteten PBMC von Respondern, mit Hilfe von magnetischen Beads und einer MACS-Isolation auf 0-3% reduziert. Dabei zeigten sich recht heterogene Ergebnisse, wobei 37,5% der Probanden keine-, 25% der Probanden eine mäßige- und 37,5% der Probanden eine starke Verminderung der Proliferationsinduktion zeigten (Dreesen 2012). Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Monozyten nicht maßgeblich an der mitogenen Wirkung der CD3 mAk beteiligt sind. Weitere Reduktionsversuche für die hier vorliegende Arbeit zeigten allerdings, dass die Heterogenität im Anteil der Monozyten begründet war. Bereits ein Anteil von mehr als 1% Monozyten war ausreichend um eine Proliferation durch CD3 mAk zu ermöglichen. Bei einem Monozytenanteil von über 2% konnte nicht einmal eine Verminderung der Proliferationsintensität detektiert werden. Daraufhin wurde der Fokus erneut auf die Monozyten gelegt. Von der Monozytenhypothese ausgehend, kamen die Wissenschaftler zur damaligen Zeit zu verschiedenen Hypothesen welche Funktion die Bindung des Antikörper Fc-Teils an die Fc γ -Rezeptoren auf Monozyten konkret erfüllt. Während einige Forschergruppen glaubten es handele sich um eine Art „Gerüstfunktion“ wodurch ein *Clustering* der TZR zustande kommt (Ceuppens et al. 1985), dachten andere, dass die Monozyten durch die Bindung der Fc γ -Rezeptoren Signale erhalten und dadurch Mediatoren freisetzen können, die ihrerseits zur Proliferation der T Lymphozyten führen (Tsoukas et al. 1985). Wieder andere bezweifelten die Monozytenhypothese und publizierten Daten die zeigten, dass die CD3 mAk induzierte T Zell Proliferation Monozyten unabhängig geschieht (Stingl et al. 1987). Mit Hilfe von Kaninchen Antikörpern, die sich gegen murines IgG richten

konnte in der vorliegenden Doktorarbeit die Funktion der Monozyten nachgeahmt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass Monozyten bei der CD3 mAk induzierten Proliferation als „Gerüst“ dienen, welches durch die Bindung der CD3 mAk Fc Teile, potentiell die ebenfalls gebundenen TZR in der T Zell Membran in räumliche Nähe bringt. Durch die Ansammlung von TZR kann somit das CD3 mAk induzierte Signal innerhalb der T Zellen verstärkt werden. Dafür spricht auch, dass an CD3 bindende Antikörper des IgM Typs trotz ihrer Pentameren oder Hexameren Struktur nicht in der Lage sind eine Proliferation in T Zellen auszulösen (Hara, Fu 1985). Auch eine Immobilisierung der CD3 mAk allein, ohne zusätzlichen anti-Maus IgG Antikörper war anders als in den Datenblättern einiger Hersteller (Exbio, BD Pharming, eBiosciences) beschrieben, nicht ausreichend um die Zellen von Non-Respondern zu stimulieren. Leider weisen Firmen, die CD3/UCHT-1 mAk vertreiben, nicht auf die Existenz von Non-Respondern hin (BD Pharming, Acris Antibodies, Biomol, Exbio, eBiosciences, BioLegend u.v.m.). Beim Kauf eines CD3 mAk sollten Kunden darauf hingewiesen werden, dass der mAk des Klons UCHT-1 zwar an CD3 binden kann und somit als Fluoreszenz gekoppelter Antikörper nutzbar ist, allerdings in funktioneller Form bei 40% der Spender nicht mitogen wirkt. Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass dieses „nicht ansprechen“ auf den Fc Teil der Antikörper zurück zu führen ist, gilt dies auch für andere CD3 Klone des IgG1 Typs wie etwa SK7 (auch bekannt als Leu-4). Weiterhin stellt sich die Frage, ob der IgG Isotyp auch für andere funktionelle Antikörper wie etwa CD4 oder CD8 mAk eine Rolle spielt.

Die in dieser Arbeit dargelegte Aufgabe der Monozyten für die Mitogenität der CD3 mAk scheint allerdings nur initial eine Rolle zu spielen. Bereits 20 h nach der Zugabe von CD3/OKT3 mAk konnten weder auf dem Plattenboden noch in der Zellsuspension Monozyten detektiert werden. Bei einer Stimulation mit CD3/UCHT-1 mAk hingegen, konnten etwa 20% der Monozyten überleben, dabei adhärirten diese, sahen aber im Vergleich zur Zellkontrolle weniger differenziert aus (vgl. Abb. 15). Ein Grund für die unterschiedliche Monozytenadhärenz zwischen den CD3 mAk der Klone UCHT-1 und OKT3 könnte in der Intensität der Proliferationsinduktion, die für CD3/OKT3 mAk verstärkt scheint, begründet sein. Da es in den Ansätzen mit Isotypkontrolle nicht zu einem Sterben der Monozyten kam, ist davon auszugehen, dass nur die gleichzeitige Bindung von TZR und Fcγ-Rezeptoren zu diesem Phänomen führt. Der erstmals in der vorliegenden Arbeit gezeigte Verlust von Monozyten aus CD3 mAk behandelten PBMC war unerwartet. Fcγ-Rezeptoren auf Monozyten werden physiologisch im Körper genutzt um antikörpermarkierte Pathogene zu binden. Nach der Bindung kommt es dann zur Phagozytose oder zur Ausschüttung von

Zytokinen seitens des Monozyten, ohne dass diese in Apoptose gehen (Daeron 1997). Ein anderer, erst kürzlich beschriebener Mechanismus, der durch die Bindung von Antikörper markierten Zellen an die Fc γ -Rezeptoren auf Monozyten ausgelöst wird, ist die Trogozytose. Dabei nimmt der Monozyt den Antikörper mitsamt des gebundenen Rezeptors auf. Dies wurde für Daclizumab, einen therapeutischen Antikörper der nach Nierentransplantationen eingesetzt wird, gezeigt. Dieser humanisierten IgG1 Antikörper bindet an CD25, die alpha Untereinheit des IL-2 Rezeptors, und verhindert so die mitogene Wirkung von IL-2. Zhang und Kollegen konnten zeigen, dass der Fc Teil von Daclizumab an Monozyten bindet und diese anschließend den Antikörper sowie das CD25 Molekül aufnehmen. Der weitere Verbleib der Monozyten wurde in dieser Studie nicht untersucht (Zhang et al. 2014).

In der dieser Arbeit vorangegangenen Masterarbeit wurde gezeigt, dass auch drei Tage nach einer CD3 mAk Stimulation noch CD3 Moleküle und daran gebundener CD3 mAk vorhanden ist. Somit kann eine Trogozytose für die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse ausgeschlossen werden. Es ist vorstellbar, dass das Verschwinden der Monozyten durch eine Inhibition von Mechanismen wie Phagozytose und Trogozytose bedingt ist (Lang et al. 2002). Die Inhibition könnte beispielsweise durch die Größe der T Lymphozyten oder die Bindung weiterer Oberflächenmoleküle an die Monozyten ausgelöst werden. Auch ein Mitwirken von NK Zellen ist denkbar und könnte durch eine Selektionierung dieser überprüft werden. Weiterhin ist vorstellbar, dass durch die hohe Anzahl an Antikörpern bzw. antikörperbedeckter T Zellen ein zu starkes Signal in den Monozyten entsteht, welches zur Apoptose führt, ähnlich wie es für IgA Antikörper beschrieben ist (Kanamaru et al. 2007). Ein weiterer beteiligter Faktor könnte das durch CD3 mAk Stimulation ausgeschüttete Zytokin IFN γ sein. IFN γ erhöht die Rezeptor vermittelte Phagozytose in Monozyten und führt durch bisher unbekannte Mechanismen zur Apoptose in Monozyten, die von intrazellulären Bakterien befallen sind (Dellacasagrande et al. 2002, Schroder et al. 2004). Eine Wirkung von löslichem Antikörper auf die Monozyten kann ausgeschlossen werden, da eine solche Bindung in dieser Arbeit experimentell nicht gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Es ist davon auszugehen, dass eine Fc γ Bindung nur stattfinden kann, wenn der Antikörper bereits an sein Zielmolekül auf Zellen gebunden hat.

4.2.3 Der CD3/UCHT-1 Responder/Non-Responder Status ist durch einen CD32a Polymorphismus bedingt

Die Hypothese von Tax et al. und weiteren Kollegen (Ceuppens et al. 1985, Looney et al. 1986), dass den Monozyten von Non-Respondern Fc γ -Rezeptoren für murines IgG1 fehlen, diese aber in Respondern vorhanden sind, konnte durch durchflusszytometrische Analysen falsifiziert werden. Im Gegensatz zur damaligen Zeit ist heute bekannt, dass es drei Formen von Fc γ -Rezeptoren (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII) mit unterschiedlichen Isoformen gibt. Unabhängig vom Responder/Non-Responder Status jedoch, konnte gezeigt werden, dass prinzipiell alle drei Rezeptoren in den PBMC aller Probanden vorhanden waren. Weiterhin ist heutzutage bekannt, welche humanen und murinen IgGs von den jeweiligen Rezeptoren gebunden werden. So bindet murines IgG1 wie bei CD3/UCHT-1 nur an Fc γ RIIa (CD32a), wohingegen murines IgG2a wie bei CD3/OKT3 an Fc γ RIIa (CD32a), aber besonders affin an Fc γ RIII (CD64) bindet (Dijstelbloem et al. 2001). Obwohl CD64 als einziger Fc γ -Rezeptor monomere IgGs binden kann, konnte eine Bindung von nicht-gebundenen Antikörpern, wie im vorherigen Abschnitt erwähnt, nicht gezeigt werden. Die CD64 Rezeptoren auf Monozyten scheinen mit monomeren IgGs abgesättigt zu sein, welche nur durch die Bindung von IgGs in Immunkomplexen ersetzt werden können (Mancardi et al. 2013). Der CD32a Rezeptor, der nur in höheren Säugetieren vorkommt, kann kein monomeres IgG binden, hat dafür aber ein breiteres Spektrum an Antikörperisotypen (IgGs), die gebunden werden können. So kann der Rezeptor als einziger Fc γ -Rezeptor humanes IgG2 sowie murines IgG1 binden (Bruhns 2012, Hulett et al. 1994).

Ein Polymorphismus in der Bindungsregion des CD32a Rezeptors führt allerdings zu einem veränderten Bindungsverhalten für eben diese IgG Typen. Dabei kommt es durch eine einzelne Basensubstitution zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin. Da sich der Anteil an Menschen mit dem Histidin tragenden CD32a Allotyp geografisch von West nach Ost erhöht und in Afrikanern besonders häufig der Arginin tragende Allotyp vorkommt, kann davon ausgegangen werden, dass der Arginin tragende Rezeptor die ursprüngliche Allelvariante darstellt (Carrington et al. 2003). Diesbezügliche Untersuchungen an nicht humanen Primaten sind leider nicht bekannt. Übersichtsberichte, die den aktuellen Stand des Wissens über humane Fc γ -Rezeptoren zusammenfassen, behandeln den CD32a Polymorphismus, befassen sich allerdings in erster Linie mit den einhergehenden Bindungseigenschaften für humane IgG Formen und weitergehend mit menschlichen Erkrankungen, die mit diesem Polymorphismus in Verbindung gebracht werden. Die

Information über die Bindungsfähigkeit der CD32a Rezeptor Isoformen für murines IgG wird dabei nicht oder nur in einem Nebensatz erwähnt (Daeron 1997, Bruhns et al. 2009).

In seltenen Fällen wird die Bindungseigenschaft für murines IgG mit dem Vorhandensein von Respondern und Non-Respondern korreliert. Jiang und Kollegen beispielsweise, die in ihrer Veröffentlichung von 1996 die PCR Methode zur Identifizierung des CD32a-H/R Polymorphismus beschrieben, verweisen in der Einleitung auf Veröffentlichungen der 80er Jahre, in denen es darum geht herauszufinden warum es Responder und Non-Responder gibt. Dies konnte jedoch nicht endgültig geklärt werden (Jiang et al. 1996, Van Wauwe et al. 1984, Tax et al. 1984). Dadurch werden der CD32a Polymorphismus und das Auftreten von Respondern und Non-Respondern allerdings nur durch Kombination der veröffentlichten Daten geschlussfolgert.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Zusammenhang zwischen dem Responder/Non-Responder Status und dem CD32a Polymorphismus durch die Untersuchung einer Vielzahl von Probanden und Patienten bestätigt werden. Zudem konnte durch die Herstellung entsprechender CD32a CHO Transfektanten erstmalig ein fundierter Beweis erbracht werden, dass die mitogene Wirkung von CD3 mAk durch die genetische Entität des Fc γ RII bedingt ist. Die Relevanz der Bindung von murinen IgG Formen zeigt sich bei der Nutzung von murinen Antikörpern, die therapeutisch eingesetzt werden, wie etwa dem CD3 Klon OKT3 (Muromonab), worauf in Abschnitt 4.3.2 näher eingegangen wird. An dieser Stelle soll zunächst ein anderer, wichtiger Aspekt angesprochen werden. Mit CD32a humantransgenen Mäusen wurde die Wirkung des Rezeptor-Polymorphismus auf verschiedene Erkrankung wie Trombozytopenie oder Anämie untersucht (McKenzie et al. 1999, Tan Sardjono et al. 2005, van Royen-Kerkhof et al. 2005). Es wurde allerdings nicht beschrieben, welchen CD32a Allotyp diese transgenen Mäuse tragen. Um mögliche Nebeneffekte durch die Bindung oder Nicht-Bindung von murinen IgGs zu bewerten, ist es allerdings notwendig diesen Allotyp zu kennen. Besonders verwunderlich ist, dass die Gruppe um Frau van Royen-Kerkhof in ihren Arbeiten von 2005 nicht auf den Polymorphismus eingehen, da sie nur ein Jahr vor dieser Arbeit Ergebnisse veröffentlichten, in denen Antikörper zur Detektion des CD32a Polymorphismus beschrieben wurden (van Royen-Kerkhof et al. 2004, van Royen-Kerkhof et al. 2005). Demnach war die Relevanz des CD32a Rezeptor Polymorphismus zumindest diesen Autoren bewusst und wurde ignoriert oder nicht dokumentiert.

4.3 Der CD3/UCHT-1 Responder/Non-Responder Status korreliert mit malignen Erkrankungen wie Hautkrebs und Leukämie

4.3.1 Der Anteil weiblicher CD3/UCHT-1 Responder ist in Krebspatienten erhöht

Zu Beginn der Untersuchungen waren die zugrundeliegenden Ursachen des Responder/Non-Responder Status noch ungeklärt. Eine der Arbeitshypothesen war, dass es sich um einen „Priming“-Effekt der reagierenden T Zellen handelt. Priming beschreibt hierbei einen Leukozytenstatus, in dem die Zellen durch noch unbekannte Faktoren vorbereitet werden auf einen pro-inflammatorischen Stimulus effizienter zu reagieren. Infolgedessen können mehr Zytokine freigesetzt werden als im naiven Zustand. Daher wurde analysiert wie die Verteilung von Respondern und Non-Respondern unter pathologischen Bedingungen aussieht.

Schon in der Masterarbeit zeigte sich ein Unterschied zwischen 24% weiblichen Respondern in der Kontrollgruppe vs. 71% weiblichen Respondern bei Erkrankten (Leukämie). Der Unterschied zwischen gesunden Probandinnen und Leukämiepatientinnen blieb auch in der vorliegenden Arbeit prinzipiell bestehen, verminderte sich jedoch auf einen Unterschied von 44% zu 64%.

Mit den Proben von Melanompatienten wurde erstmals eine weitere Gruppe maligner Erkrankungen mit in die Analysen aufgenommen. Bei dieser Erkrankung zeigte sich in der weiblichen Population, mit 73% Respondern, sogar ein noch deutlicherer Unterschied zu den Ergebnissen der weiblichen Kontrollprobanden. Daher fokussierten sich weitere Untersuchungen vermehrt auf die Melanompatienten. Weitere Gründe dafür sind, dass sich Melanomerkrankungen einfach in vier Stadien einteilen lassen, wobei es bei der Leukämie für jede der vier Hauptformen noch zahlreiche Unterformen sowie weitere hämatologische Neoplasien gibt (vgl. 1.8.1), die sich wiederum in verschiedene Subformen unterteilen lassen. Zudem wurde gezeigt, dass die Zellen von 18% der Leukämiepatienten auch auf die Stimulation mit CD3/OKT3 nicht mit einer Zellproliferation reagierten. Da CD3/OKT3 bei den Zellen aller Kontrollprobanden mitogen wirkte, erschwert dieser Befund die Analyse zur funktionellen Bedeutung des CD3/UCHT-1 Responder Status zusätzlich. Eine nicht-mitogene Wirkung von CD3/OKT3 auf periphere T Zellen ist zwar bereits beschrieben (Ceuppens et al. 1985), allerdings handelte es sich dabei um Probanden einer Familie, die aufgrund ihres Verwandtschaftsverhältnisses einen genetischen Defekt teilten, der zu diesem Phänomen führte. Für das Auftreten bei den Leukämie-Patienten ist es viel eher denkbar, dass ein

Zusammenhang zur therapeutischen Behandlung besteht. Nach einer Knochenmarktransplantation beispielsweise werden die Patienten mit Immunsuppressiva behandelt, wodurch eine Unempfindlichkeit für CD3 mAk entstehen könnte. Falls es sich bei diesen Patienten um T Zell Leukämien handelt, ist es ebenfalls möglich, dass die T Zellen im Laufe der Hämatopoese nicht ausreichend differenzierten um CD3 Moleküle zu exprimieren oder intrazellulär die notwendige Verknüpfung mit Signalmolekülen herzustellen (Ginaldi et al. 1996). Eine genaue Analyse der Patienten im Hinblick auf ihre Leukämieform und ihren therapeutischen Status konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geleistet werden.

Der Befund, dass der Responder/Non-Responder Status genetisch determiniert ist, stellte die Patientendaten in ein neues Licht. Wie bereits erwähnt gibt es eine Reihe von Arbeiten, die den CD32a Arginin/Histidin Polymorphismus in Verbindung mit den unterschiedlichsten Erkrankungen bringen. Am besten verstanden ist dabei der Zusammenhang zu Infektionen mit verkapselnden Bakterien (Sanders et al. 1993), aber auch Autoimmunerkrankungen und neurologische Erkrankungen werden diskutiert (van der Pol et al. 2000). Ein Zusammenhang mit Krebserkrankungen ist bis dato allerdings nicht bekannt.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist sowohl für Melanompatientinnen als auch für Leukämiepatientinnen ein deutlich erhöhter Anteil an Respondern zu finden. Dieses Ergebnis legt nahe, dass Frauen mit einem Responder-Status ein erhöhtes Risiko für maligne Erkrankungen haben könnten. Eine weitere Möglichkeit den erhöhten Anteil von Respondern in Patientinnen zu deuten ist, dass Non-Responder bereits vor dem Ausbruch oder zu Beginn der Krankheit sterben und daher nicht in die Statistik einfließen. In Folge dessen, müsste der Anteil weiblicher Non-Responder für die Kontrollprobanden mit zunehmendem Alter sinken, was in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden konnte. Ob das Vorkommen von Krebs bei Respondern einen kausalen Zusammenhang hat oder nur eine Koinzidenz vorliegt bleibt zu untersuchen.

Es ist denkbar, dass der CD32a Rezeptor eine Funktion in der Erkennung von Tumoren spielt. Würden beispielsweise Tumorzellen mit humanen IgG2 Antikörpern markiert werden, wären diese für den Responder Rezeptor auf Monozyten und Granulozyten nicht detektierbar und die Zellen können der Phagozytose entgehen (Salmon et al. 1992). Da der Polymorphismus nur für weibliche Individuen eine Relevanz zeigt, ist ein Mitwirken weiterer Faktoren anzunehmen. Hierbei ist zunächst an Hormone zu denken (Kontrazeptiva, Wechseljahre), aber auch andere Faktoren wie beispielsweise der Lebenswandel (Ernährung, Sport, Drogen) könnten eine Rolle spielen.

Die bisherige Analyse der Daten von Melanompatienten ergab überdies Hinweise, dass auch der Verlauf der Krankheit im Zusammenhang mit dem Genotyp des CD32a Rezeptors steht. So zeigte sich ein Trend, dass Patienten im Stadium IV eine geringere fünf Jahres Überlebenschance haben, wenn sie Responder sind. Ein weiterer, überdies noch deutlicherer Hinweis zeigt sich für weibliche, homozygote Responder, die ein verkürztes Metastase freies Überleben aufwiesen. Möglicherweise geht es auch hierbei um eine Rolle bei der Immunevasion, sowohl für die Zellen im Tumor als auch metastasierende Tumorzellen. Um dieses Ergebnis zu verifizieren ist allerdings eine deutlich höhere Stichprobenzahl notwendig. Eine schlechtere Überlebenschance für Responder kann auch im Zusammenhang mit der früheren Diagnose des Melanoms bei Non-Respondern stehen. Trotz vergleichbarer Tumordicke bekommen Non-Responder im Schnitt fünf bis zehn Jahre früher die Diagnose Melanom gestellt. Die vergleichsweise besseren Überlebenschancen könnten demnach mit dem Alter zusammenhängen. Andererseits ist es auch denkbar, dass trotz vergleichbarer Tumordicke das Melanom eines Non-Responder weniger fortgeschritten ist, beispielsweise wie eine Tendenz der vorliegenden Daten andeutete, eine geringere Ulzeration aufweist (vgl. Abb. 29). Eine frühere Diagnose deutet schon generell auf bessere Heilungs- bzw. Überlebenschancen hin. Eine frühere Diagnose bedeutet allerdings auch, dass Non-Responder Patienten früher einen Arzt aufsuchen. Ursachen dafür könnten ein erhöhter Leidensdruck (bspw. Druckempfindung oder Juckreiz) oder eine optische Veränderung am Melanom (z.B. markante Färbung oder Größe) sein, die bei Respondern weniger stark ausgeprägt sind. Aufklärung könnte in diesem Fall eine empirische Studie mit Patientenbefragungen und eine größere Stichprobenzahl liefern.

Der Zusammenhang zwischen männlichen Non-Respondern und einer BRAF Mutation scheint zunächst unverständlich, da eine BRAF Mutation vor allem durch UV-Strahlung ausgelöst wird (Brash 2015). Ein möglicher Erklärungsansatz könnten reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sein. ROS entstehen durch UVA Strahlung und schädigen indirekt die DNA wodurch es zu Mutationen kommen kann. Auch Phagozyten wie Monozyten und Neutrophile nutzen ROS um Viren und Bakterien zu bekämpfen (Dupre-Crochet et al. 2013). Durch eine Infektion mit etwa verkapselnden Bakterien kann es bei Non-Respondern zu einem Anstieg von ROS durch Phagozyten kommen. Eventuell erhöht zusätzliche UVA-Strahlung die ROS Menge soweit, dass eine DNA Mutation stark begünstigt ist. Diese Theorie ist allerdings sehr hypothetisch und erklärt nicht den erneut auftretenden Geschlechterunterschied. Leider ist dieses Ergebnis trotz Signifikanz bei einem Stichprobenumfang von fünf männlichen Non-Respondern generell mit Vorsicht zu

betrachten, da der Mindest-Probenumfang bei dem hierbei durchgeführten Chi Quadrat Test ebenfalls bei fünf liegt (McDonald). Eine Erhöhung des Stichprobenumfangs ist in diesem Fall unabdingbar.

Um herauszufinden worin der Einfluss des CD32a Polymorphismus bei Krebspatientinnen im Detail liegt, ist noch weitere Forschung nötig. Um zusätzliche Ansatzpunkte zu finden, könnte es hilfreich sein, detaillierte Daten über die Krankheits-Vorgeschichte von Respondern und Non-Respondern bei Gesunden und Erkrankten zu sammeln. Durch diese empirischen Daten könnten mögliche Zusammenhänge mit Vorerkrankungen hergestellt werden, welche neue Zusammenhänge zwischen der Krebsentstehung und dem Polymorphismus zulassen. Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Untersuchung und Unterscheidung von Respondern und Non-Respondern könnte das Thema Therapieempfehlung sein. Es ist gut vorstellbar, dass der Responder/Non-Responder Status einen Einfluss auf den Erfolg einer Therapie haben kann. Dabei ist vornehmlich an eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern zu denken. Für den humanisierten, therapeutischen Antikörper Trastuzumab, der bei Brust- und Magenkrebspatienten eingesetzt wird, ist bereits die Wirksamkeit in Abhängigkeit von einem Polymorphismus im FcγRIII (CD16) beschrieben. Dabei können Individuen mit einem Valin in der Bindungsregion des CD16 Rezeptors mehr humanes IgG1 (wie bei Trastuzumab) und IgG3 binden als Individuen mit einem Phenylalanin an dieser Stelle (Clynes et al. 2000). Ein vergleichbarer Effekt würde auch für die Bindung von Antikörperisotypen mit murinem IgG1 sowie humanem IgG2 und dem Polymorphismus im CD32a Gen auftreten.

Auch in anderen Gebieten ist ein möglicher Einfluss des Responder/Non-Responder Status denkbar. Die Verbindung zwischen diesem Status und Krebs (Melanom, Leukämie) zeigte sich zwar nur durch eine Koinzidenz, durch die Daten der vorliegenden Arbeit wurde jedoch deutlich, dass sich die Leukozyten von Respondern und Non-Respondern unterscheiden. So ist beispielsweise die Quantität der Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen in Respondern erhöht, wodurch Immunreaktionen verändert sein können. Beispielhaft könnte man an dieser Stelle an einen Einfluss auf den Ausgang von Impfungen denken. Etwa Grippe-Impfstoffen sind aus nicht bekannten Gründen nur bei durchschnittlich 70% der Patienten wirkungsvoll (Benoit et al. 2015). Diese 70% liegen nah an der Anzahl gesunder Responder (60%). Durch eine standardmäßige Bestimmung des Responder/Non-Responder Status vor Impfungen oder Therapiebeginn könnten weitere Korrelationen zwischen Respondern/Non-Respondern und einem Therapieausgang hergestellt werden.

4.3.2 Die Kenntnis des CD3/UCHT-1 Responder und Non-Responder Status ist sowohl klinisch als auch experimentell von Bedeutung

Warum das Wissen über den Responder/Non-Responder Status so entscheidend ist, zeigt sich in der Geschichte von therapeutischen Antikörpern. Eine Deaktivierung oder Eliminierung von T Zellen ist eine gängige Methode um Transplantationsabstoßungen oder die dadurch entstehende Transplantat-gegen-Wirt Reaktion zu minimieren. CD3/OKT3 war der erste monoklonale Antikörper der 1986 in Deutschland zur Therapie akuter Transplantationsabstoßungen unter dem Namen Muromonab (Orthoclone® OKT3) eingesetzt wurde (Filev et al. 1989). Entgegengesetzt zur aktivierenden Wirkung *in vitro* wird CD3/OKT3 *in vivo* zur Inhibition der T Zell Aktivierung eingesetzt. Die mitogene Wirkung des CD3/OKT3 mAk führt dabei allerdings, besonders nach der ersten Injektion des Antikörpers, zu schweren Nebenwirkungen, die als Zytokin-Freisetzungssyndrom bezeichnet werden. Dabei wird besonders viel TNF α , IFN γ und IL-10 ausgeschüttet, was zu Fieber, Schüttelfrost, Übelkeit und bis hin zum Atem- oder Herzstillstand und Tod führen kann. (Abramowicz et al. 1989, Coelho et al. 2012). Alle drei Zytokine konnten in der vorliegenden Arbeit bei einer CD3/OKT3 mAk Stimulation von PBMC ebenfalls gemessen werden. Da diese Zytokine vor allem durch Monozyten freigesetzt werden, scheint der Bindung des Antikörpers an T Lymphozyten auch *in vivo* eine Fc γ -Rezeptor-Bindung an Monozyten zu folgen. Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnten, dass die Monozyten durch diese Art der Bindung sterben, können sich durch die Monozytenreduktion *in vivo* weitere Komplikationen ergeben. Darunter zählen eine zusätzlich geschwächte Abwehr gegen Pathogene oder gar chronische Entzündungen (Fiala et al. 1975, Alangaden et al. 2006). Zu den weiteren akuten Nebenwirkungen von Muromonab zählt ein anaphylaktischer Schock, der durch eine Reaktion gegen das Mausprotein ausgelöst wird (Mutschler et al. 2001). Da es mittlerweile Medikamente mit weniger schweren Nebenwirkungen gibt, nahm der Hersteller Muromonab 2010 vom Markt. Stattdessen ist der goldene Standard eine Behandlung mit dem polyklonalen Antikörper Anti Thymozyten Globulin (ATG), der gegen T Zellen gerichtet ist. Doch auch für diesen therapeutischen Antikörper treten die zuvor erwähnten Nebenwirkungen, wenn auch in geminderter Intensität, auf (Mahmud et al. 2010, Reichert 2012, Hellemans et al. 2015). Da auch diese geminderten Nebenwirkungen nicht unerheblich sind, wird bereits seit über zehn Jahren an der Erforschung humanisierter Antikörper gearbeitet. Li und Kollegen beschreiben 2005 einen humanisierten CD3/OKT3 mAk namens hu12F6mu, der *in vitro* nicht mitogen, aber immunsuppressiv wirkt (Li et al. 2005). Einige Jahre später wird die Wirkung *in vivo* durch eine klinische Studie der Phase I veröffentlicht

(Li et al. 2010). Inwiefern dieser Antikörper weiter verfolgt wird ist nicht bekannt, aktuell gibt es keine laufenden klinischen Studien (clinicaltriel.gov, Stand: 28.03.2015). Die Gruppe um Danlin Xu, Jeffrey A. Bluestone und Linda K. Jolliffe haben bereits 1999 eine klinische Studie der Phase I veröffentlicht und beschrieben den humanisierten CD3/OKT3 mAk huOKT3 γ 1. Hierbei wurde der Antikörper nicht nur humanisiert, sondern zusätzlich die Fc Region mutiert, damit auch der humane Fc Teil nicht von Fc γ -Rezeptoren gebunden werden kann (Woodle et al. 1999). Es folgten weitere Untersuchungen des Antikörpers *in vivo* und *in vitro*, die alle eine immunsuppressive und nicht mitogene Wirkung des Antikörpers bestätigten (Xu et al. 2000, Utset et al. 2002, Herold et al. 2002). Nach dem Jahr 2002 gibt es keine weiteren Veröffentlichungen über diesen Antikörper und auch hierfür sind aktuell keine klinischen Studien verzeichnet (clinicaltriel.gov, Stand: 28.03.2015). Eine Möglichkeit warum diese Antikörper nicht weiter verfolgt werden, könnte die verminderte Affinität von humanisierten Antikörpern sein (Jones et al. 1986).

Seit Entwicklung der CD3 mAk UCHT-1 und OKT3 liegt das Augenmerk der Forscher und Mediziner deutlich bei dem CD3/OKT3 mAk. Sucht man in der Datenbank PubMed.gov nach „UCHT-1 antibody“, ergeben sich 123 Suchresultate, bei der Suche nach „OKT3 antibody“ hingegen sind es 3688. Bezieht man zusätzlich das Wort Proliferation in die Suchanfrage mit ein, ergeben sich für „UCHT-1 antibody proliferation“ nur noch 23 Treffer, wobei sich für „OKT3 antibody proliferation“ 484 Treffer ergeben (Stand: 27.03.15). Nach der durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erlangten aktuellen Datenlage ist es denkbar, dass CD3/UCHT-1 mAk für Non-Responder, anders als CD3/OKT3 mAk weniger Nebenwirkungen als therapeutische Antikörper aufweisen würden. Es würde nicht zu einer Sekretion von Zytokinen und nicht zum Sterben von Monozyten kommen. Die ersten Beschreibungen über den Einsatz von therapeutischen CD3/UCHT-1 mAk tauchen in den Jahren 2007-2008 auf (Woo et al. 2008). Hierbei handelt es sich allerdings um einen bivalenten Antikörper der CD3/UCHT-1 mit einem Immunotoxin verlinkt, wodurch nach Bindung des Antikörpers die T Zelle abgetötet werden soll. Die Indikation liegt daher eher bei malignen Erkrankungen des T Zell Systems. Dieser bivalente Antikörper, mit dem Namen A-dmDT390-bisFv, wird zurzeit in zwei klinischen Studien getestet (clinicaltrial.gov, Stand: 28.03.2015). Untersuchungen zu CD3/UCHT-1 mAk im Bereich der Immunsuppression sind nicht bekannt.

Ein weiterer Aspekt für die therapeutische Nutzung von CD3 mAk ist, wie aus der vorliegenden Arbeit hervorgeht, dass die Bindung eines CD3 mAk die T Zellen in gewisser Weise vorbereitet und diese somit auf einen Ko-Stimulus reagieren können. T Lymphozyten

reagieren allerdings nicht isoliert und viele weitere Zellen wie andere Leukozyten oder Epithelzellen exprimieren ko-stimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche, zudem transportieren auch MV ko-stimulatorische Moleküle in Körperflüssigkeiten. Daher ist auch bei der Nutzung von gekoppelten CD3 mAk zu beachten, dass es zu einer unerwünschten Aktivierung von Zellen kommen kann.

Zusammenfassend muss bei der Arbeit mit CD3 mAk beachtet werden, dass murine Antikörper des IgG1 Typs nur für Responder Individuen mitogen sind, dass der freie Fc Teil der mAk an Monozyten binden kann, wodurch diese sterben und, dass auch konjugierte CD3 mAk eine gewisse Vor-Stimulation von T Zellen einleiten, die durch Ko-Stimulatoren, die auf verschiedenen Zelltypen vorkommen, vollendet werden kann. Dabei ist der Isotyp von therapeutischen Antikörpern auch für humanisierte Antikörper zu beachten. Weiterhin ist durchaus denkbar, dass die Entwicklung therapeutischer CD3 mAk bereits weiter fortgeschritten wäre, wenn die in der vorliegenden Arbeit unternommenen funktionellen Untersuchungen der Antikörper den Versuchen in Patienten zuvor gekommen wären.

4.3.3 Ein ELISA kann als phänotypischer Responder/Non-Responder Schnelltest genutzt werden

Die in der vorliegenden Arbeit erlangten Ergebnisse geben Anlass zur Annahme, dass der Responder/Non-Responder Status für verschiedenste klinische Aspekte von Bedeutung sein könnte. Daher ist es wichtig geeignete Nachweismethoden für eben diesen Status zu haben. Der Phänotyp Responder oder Non-Responder ist die Antwort auf die Frage, ob löslicher CD3/UCHT-1 mAk (oder andere murine IgG1 Klone) eine mitogene Wirkung auf die Proliferation von T Lymphozyten ausüben. Um den Phänotyp eines Probanden testen zu können kommen daher klassischerweise Proliferationsassays zum Einsatz. Mit einem BrdU-Proliferationsassay kann nicht nur gemessen werden, ob die zu untersuchenden Zellen proliferiert sind, sondern auch ein Vergleich der Proliferationsintensität zwischen verschiedenen Ansätzen eines Versuchs hergestellt werden. Der Nachteil dieser Methode ist zum einen, dass die Messung nur eine Auskunft über eine Proliferation in einem Zeitraum von maximal 20 h gibt. Zum anderen ist es für die Detektion des BrdU notwendig die Zellen zu zerstören, weshalb keine weiteren Analysen dieser Zellen möglich sind (Dover, Patel 1994, McGinley et al. 2000). Um beispielsweise messen zu können, welcher Zelltyp der untersuchten PBMC auf die Stimulation mit CD3 mAk reagiert, wurde ein CFSE Assay genutzt. Dabei ist es möglich die Proliferation über einen längeren Zeitraum zu messen und

eine Aussage über die Anzahl der Zellteilungen zu bekommen (Fulcher, Wong 1999). Aufgrund der Kostenintensität und dem hohen Probenumfang in den Versuchen der vorliegenden Arbeit, wurde der Responder/Non-Responder Status einiger Probanden und Patienten durch optische Auswertung im Durchflusszytometer bestimmt. Da es eine hundertprozentige Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp des Responder/Non-Responder Status gab, kann diese Methode als zuverlässig gewertet werden. All diese Methoden setzen eine ein- bis dreitägige Stimulation der Zellen voraus. Aufgrund des Wissens um die Ursache des Responder/Non-Responder Status wurde in der vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt, die mit Vollblut und ohne eine Stimulation der Zellen funktioniert und daher als Schnelltest in vielen Laboren eingesetzt werden könnte.

Um einem Schnelltest gerecht zu werden, könnten Mikrotiterplatten (vorzugsweise mit abtrennbaren Wells zur Einzelbestimmung) mit Ligand (Ratten CEACAM1), Blockierung und dem Maus-IgG1 Antikörper Be9.2 vorbestückt werden. Für den Schnelltest müsste nun lediglich Vollblut inkubiert, abgewaschen und die gebundenen Zellen mit CD14 und HRP detektiert werden. Für eine weitere Zeitersparnis kann bestenfalls direkt gekoppeltes CD14 genutzt werden. Mit der Inkubationszeit von TMB, dem Abstoppen mit Schwefelsäure und der Messung im Mikroplatten Spektrometer könnte der Test auch für eine Vielzahl von Probanden/Patienten innerhalb von 3-4 h abgeschlossen werden.

Möchte man nicht nur phänotypisch sondern genotypisch zwischen Responder und Non-Responder unterscheiden und somit auch homo- und heterozygote Responder identifizieren, kann wie in dieser Arbeit gezeigt eine PCR Analyse durchgeführt werden. Die schnellste Variante mit der Möglichkeit den Status einzelner Probanden/Patienten ohne viel Aufwand zu detektieren würde die durchflusszytometrische Messung mit spezifischen Antikörpern bieten. Nötig wären dazu zwei unterschiedliche Antikörper gegen CD32a. Ein Antikörper welcher nur den Histidin₁₆₆-tragenden Rezeptor erkennt und ein Antikörper der nur den Arginin₁₆₆-tragenden Rezeptor erkennt. Somit könnte nur jeweils einer der Antikörper an Monozyten von Non-Respondern und homozygote Respondern binden, aber beide Antikörper an die Monozyten von heterozygoten Respondern. Im Jahre 2004 wurden genau solche Antikörper in einer Veröffentlichung der Gruppe von Herrn Dr. J. Van de Winkel beschrieben. Einer dieser Antikörper, MDE-9 wurde 2005 schließlich patentiert (van Royen-Kerkhof et al. 2004). Diese Antikörper sind allerdings nicht käuflich erwerblich. Auch eine Kontaktaufnahme mit den Autoren der besagten Veröffentlichung hatte keinen Erfolg, weswegen diese Antikörper nicht getestet werden konnten und der Verbleib unbekannt ist.

5 Zusammenfassung

Die Interaktion des T Zell Rezeptors (TZR) mit MHC präsentierten Antigenen führt in Anwesenheit eines Ko-Stimulus (z.B. CD28 Ligand) zu einer Proliferation von T Zellen. *In vitro* wird dies durch eine Kombination aus immobilisierten, monoklonalen anti-CD3 Antikörpern (mAk) und löslichen anti-CD28 mAk simuliert. In der vorliegenden Arbeit wurden T Zell Antworten auf CD3 mAk zweier unterschiedlicher Hybridome, den Klonen CD3/OKT3 (Maus IgG2a) und CD3/UCHT-1 (Maus IgG1) untersucht. Da T Lymphozyten *in vivo* nicht isoliert von anderen Zellen vorkommen, wurden die Versuche mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) durchgeführt. Beide CD3 mAk waren in der Lage ohne Immobilisation und Ko-Stimulus eine vergleichbar effiziente T Zell Aktivierung auszulösen. Dabei proliferierten vor allem CD8⁺ T Zellen. Eine Stimulation mit CD3/UCHT-1 mAk führte im Gegensatz zum CD3/OKT3 mAk allerdings nicht zur Freisetzung von IL-2. Überraschenderweise wurde auch keine Signalkette über die klassische TZR Signalkaskade induziert. Folglich simulieren CD3 mAk keinen physiologischen T Zell Stimulus.

Funktionelle Analysen zeigten, dass die PBMC aller gesunden Probanden (n = 101) mit Proliferation auf eine CD3/OKT3 mAk Behandlung reagierten, bei einer Stimulation mit CD3/UCHT-1 mAk hingegen proliferierten nur die Zellen von 60% der Probanden (CD3/UCHT-1 Responder und Non-Respondern). Dem zugrunde liegt ein *Clustering* der TZR, ausgelöst durch die Bindung des Fc Teils (Maus IgG1) der CD3/UCHT-1 mAk von FcγII-Rezeptoren (CD32a) auf Monozyten (CD3/OKT3 interagiert mit CD64). Non-Responder verlieren aufgrund eines Basenaustausches im CD32a Gen die Bindungsfähigkeit für murines IgG1. Somit konnte gezeigt werden, dass der CD3/UCHT-1 Responder/Non-Responder Status durch einen Polymorphismus im CD32a Gen determiniert wird. Weiterhin wird deutlich, wie wichtig die Wahl des geeigneten Antikörper-Isotyps für *in vivo* und *in vitro* Anwendungen ist.

Erstaunlicherweise fanden sich in Melanom- und Leukämiepatientinnen deutlich mehr Responder als bei den gesunden Probandinnen. Hierdurch konnte erstmals eine Assoziation zwischen dem CD32a Polymorphismus und der Anfälligkeit für Krebserkrankungen hergestellt werden. Ob dies jedoch eine Koinzidenz ist oder ein kausaler Zusammenhang besteht erfordert weitere Untersuchungen. Dabei gewonnene Erkenntnisse können eine Relevanz des „UCHT-1-Responder“-Status für die klinische Anwendung etablieren, beispielsweise als prädiktiver Marker oder für die Therapieempfehlung im Rahmen einer personalisierten medizinischen Behandlung.

Abstract

According to literature, the interaction of the T cell receptor (TCR) with antigen presenting cells causes T cell activation solely in the presence of co-stimulating factors like CD28-ligands. Since CD3 receptors are required for TCR signaling, immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies (mAb) are commonly used in combination with anti-CD28 to mimic T cell stimulation *in vitro*. In the present study, the mechanism of T cell activation triggered by anti-CD3 mAb was investigated comprehensively utilizing two different anti-CD3 mAbs, namely CD3/OKT3 (mouse IgG2a) and CD3/UCHT-1 (mouse IgG1). Since *in vivo* T cells do not act independently of other cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were used in these studies. Antibodies of both CD3 hybridomas were found to induce T cell proliferation even in the absence of additional co-stimuli and when applied solubly. Application of soluble CD3 mAb led to enhanced proliferation of CD8⁺ T cells. The antibodies of both CD3 clones provided analogous T cell responses although there was no detectable IL-2 release from PBMC treated with CD3/UCHT-1. Remarkably antibodies of both clones did not induce proliferation via the TCR signaling cascade.

Functional analyses demonstrated that PBMC from all healthy donors (n=101) responded with proliferation to CD3/OKT3 treatment. In contrast, proliferation was detectable only in PBMC from 60% of the healthy donors treated with CD3/UCHT-1. Further studies showed that CD3/UCHT-1 responsiveness was caused by the presence of monocytes which crosslinked TCRs via binding of CD3 mAb Fc part by Fcγ receptors (FcγRII/CD32a=mouse IgG1 Fc, FcγRI/CD64=mouse IgG2). Therefore, we could show that the state of responsiveness is genetically determined by a polymorphism in the Fcγ receptor CD32a, which renders Non-Responder insensitive to murine IgG1. Surprisingly, the rate of individuals whose cells responded to CD3/UCHT-1 treatment was higher in melanoma and leukemia patients than in healthy donors.

Our results illustrate that anti-CD3 mAbs do not mimic physiological TCR stimulation and emphasize that antibody isoforms for *in vitro* as well as *in vivo* applications need to be chosen carefully with respect to their capability of binding Fcγ receptors. Furthermore, CD3/UCHT-1 responsiveness is genetically determined by a CD32a polymorphism and our results indicate that the CD32a genotype might be associated with an increased susceptibility to melanoma. Thus, the pathogenic role of this polymorphism in melanoma development warrants further studies.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Abramowicz, D., Schandene, L., Goldman, M., Crusiaux, A., Vereerstraeten, P., De Pauw, L., Wybran, J., Kinnaert, P., Dupont, E., Toussaint, C. (1989): Release of tumor necrosis factor, interleukin-2, and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 47, 606-608.
- 2 Aderem, A., Underhill, D.M. (1999): Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593-623.
- 3 Alangaden, G.J., Thyagarajan, R., Gruber, S.A., Morawski, K., Garnick, J., El-Amm, J.M., West, M.S., Sillix, D.H., Chandrasekar, P.H., Haririan, A. (2006): Infectious complications after kidney transplantation: current epidemiology and associated risk factors. *Clin. Transplant.* 20, 401-409.
- 4 Al-Nedawi, K., Meehan, B., Rak, J. (2009): Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell. Cycle*. 8, 2014-2018.
- 5 Amadori, A., Zamarchi, R., De Silvestro, G., Forza, G., Cavatton, G., Danieli, G.A., Clementi, M., Chieco-Bianchi, L. (1995): Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat. Med.* 1, 1279-1283.
- 6 Andreassi, L., Flori, M.L., Rubegni, P. (1999): Sun and skin. Role of phototype and skin colour. *Adv. Exp. Med. Biol.* 455, 469-475.
- 7 Appleman, L.J., Berezovskaya, A., Grass, I., Boussiotis, V.A. (2000): CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression. *J. Immunol.* 164, 144-151.
- 8 August, A., Dupont, B. (1994): Activation of src family kinase lck following CD28 crosslinking in the Jurkat leukemic cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 1466-1473.
- 9 Bach, E.A., Aguet, M., Schreiber, R.D. (1997): The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 563-591.
- 10 Baggiolini, M. (2001): Chemokines in pathology and medicine. *J. Intern. Med.* 250, 91-104.
- 11 Bardel, E., Larousserie, F., Charlot-Rabiega, P., Coulomb-L'Hermine, A., Devergne, O. (2008): Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J. Immunol.* 181, 6898-6905.
- 12 Bastian, B.C. (2014): The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu. Rev. Pathol.* 9, 239-271.
- 13 Becquart, P., Wauquier, N., Mahlakoiv, T., Nkoghe, D., Padilla, C., Souris, M., Ollomo, B., Gonzalez, J.P., De Lamballerie, X., Kazanji, M., Leroy, E.M. (2010): High prevalence of both humoral and cellular immunity to Zaire ebolavirus among rural populations in Gabon. *PLoS One*. 5, e9126.

- 14 Bedikian, A.Y., Garbe, C., Conry, R., Lebbe, C., Grob, J.J., Genasense Melanoma Study Group. (2014): Dacarbazine with or without oblimersen (a Bcl-2 antisense oligonucleotide) in chemotherapy-naïve patients with advanced melanoma and low-normal serum lactate dehydrogenase: 'The AGENDA trial'. *Melanoma Res.* 24, 237-243.
- 15 Benoit, A., Legrand, C., Dewe, W. (2015): Influenza vaccine efficacy trials: a simulation approach to understand failures from the past. *Pharm. Stat.*
- 16 Ben-Sasson, S.Z., Hu-Li, J., Quiel, J., Cauchetaux, S., Ratner, M., Shapira, I., Dinarello, C.A., Paul, W.E. (2009): IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7119-7124.
- 17 Bohana-Kashtan, O., Ziporen, L., Donin, N., Kraus, S., Fishelson, Z. (2004): Cell signals transduced by complement. *Mol. Immunol.* 41, 583-597.
- 18 Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., Thompson, C.B. (2010): CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xL. *Immunity.* 1995. 3: 87-98. *J. Immunol.* 185, 3788-3799.
- 19 Boon, T., Coulie, P.G., Van den Eynde, B.J., van der Bruggen, P. (2006): Human T cell responses against melanoma. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 175-208.
- 20 Boussiotis, V.A., Lee, B.J., Freeman, G.J., Gribben, J.G., Nadler, L.M. (1997): Induction of T cell clonal anergy results in resistance, whereas CD28-mediated costimulation primes for susceptibility to Fas- and Bax-mediated programmed cell death. *J. Immunol.* 159, 3156-3167.
- 21 Boyman, O., Hefti, H.P., Conrad, C., Nickoloff, B.J., Suter, M., Nestle, F.O. (2004): Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor-alpha. *J. Exp. Med.* 199, 731-736.
- 22 Boyum, A. (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 97, 77-89.
- 23 Brash, D.E. (2015): UV signature mutations. *Photochem. Photobiol.* 91, 15-26.
- 24 Bruhns, P. (2012): Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood.* 119, 5640-5649.
- 25 Bruhns, P. (2012): Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood.* 119, 5640-5649.
- 26 Bruhns, P. (2012): Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood.* 119, 5640-5649.
- 27 Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., Daeron, M. (2009): Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood.* 113, 3716-3725.
- 28 Bruttel, V.S., Wischhusen, J. (2014): Cancer stem cell immunology: key to understanding tumorigenesis and tumor immune escape? *Front. Immunol.* 5, 360.

- 29 Bukowski, J.F., Warner, J.F., Dennert, G., Welsh, R.M. (1985): Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *J. Exp. Med.* 161, 40-52.
- 30 Cantoni, N.,Recher, M. (2014): Primary and secondary immunodeficiencies. *Ther. Umsch.* 71, 31-43.
- 31 Carrington, C.V., Norman, P.J., Vaughan, R.W., Kondeatis, E., Ramdath, D.D., Hameed, K., Stephens, H.A. (2003): Analysis of Fc gamma receptor II (CD32) polymorphism in populations of African and South Asian ancestry reveals east-west geographic gradients of allele frequencies. *Eur. J. Immunogenet.* 30, 375-379.
- 32 Ceuppens, J.L., Bloemmen, F.J., Van Wauwe, J.P. (1985): T cell unresponsiveness to the mitogenic activity of OKT3 antibody results from a deficiency of monocyte Fc gamma receptors for murine IgG2a and inability to cross-link the T3-Ti complex. *J. Immunol.* 135, 3882-3886.
- 33 Ceuppens, J.L., Meurs, L., Van Wauwe, J.P. (1985): Failure of OKT3 monoclonal antibody to induce lymphocyte mitogenesis: a familial defect in monocyte helper function. *J. Immunol.* 134, 1498-1502.
- 34 Chai, J.G., Vendetti, S., Bartok, I., Schoendorf, D., Takacs, K., Elliott, J., Lechler, R., Dyson, J. (1999): Critical role of costimulation in the activation of naive antigen-specific TCR transgenic CD8+ T cells in vitro. *J. Immunol.* 163, 1298-1305.
- 35 Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., O'Day, S.J., Sosman, J.A., Kirkwood, J.M., Eggermont, A.M., Dreno, B., Nolop, K., Li, J., Nelson, B., Hou, J., Lee, R.J., Flaherty, K.T., McArthur, G.A., BRIM-3 Study Group. (2011): Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* 364, 2507-2516.
- 36 Cicciarelli, J.C., Kasahara, N., Lemp, N.A., Adamson, R., Dembitsky, W., Browne, B., Steinberg, S. (2013): Immunoglobulin G subclass analysis of HLA donor specific antibodies in heart and renal transplant recipients. *Clin. Transpl.* 413-422.
- 37 Clayton, A.,Mason, M.D. (2009): Exosomes in tumour immunity. *Curr. Oncol.* 16, 46-49.
- 38 Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., Ravetch, J.V. (2000): Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.* 6, 443-446.
- 39 Coccia, M., Harrison, O.J., Schiering, C., Asquith, M.J., Becher, B., Powrie, F., Maloy, K.J. (2012): IL-1beta mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4+ Th17 cells. *J. Exp. Med.* 209, 1595-1609.
- 40 Coelho, T., Tredger, M., Dhawan, A. (2012): Current status of immunosuppressive agents for solid organ transplantation in children. *Pediatr. Transplant.* 16, 106-122.
- 41 Daeron, M. (1997): Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 203-234.
- 42 Daeron, M. (1997): Fc receptor biology. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 203-234.

- 43 Dellacasagrande, J., Ghigo, E., Raoult, D., Capo, C., Mege, J.L. (2002): IFN-gamma-induced apoptosis and microbicidal activity in monocytes harboring the intracellular bacterium *Coxiella burnetii* require membrane TNF and homotypic cell adherence. *J. Immunol.* 169, 6309-6315.
- 44 Dienz, O., Rincon, M. (2009): The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clin. Immunol.* 130, 27-33.
- 45 Dijkstra, H.M., Bijl, M., Fijnheer, R., Scheepers, R.H., Oost, W.W., Jansen, M.D., Sluiter, W.J., Limburg, P.C., Derksen, R.H., van de Winkel, J.G., Kallenberg, C.G. (2000): Fcγ receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes. *Arthritis Rheum.* 43, 2793-2800.
- 46 Dijkstra, H.M., van de Winkel, J.G., Kallenberg, C.G. (2001): Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunol.* 22, 510-516.
- 47 Dijkstra, H.M., van de Winkel, J.G., Kallenberg, C.G. (2001): Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunol.* 22, 510-516.
- 48 Dijkstra, H.M., van de Winkel, J.G., Kallenberg, C.G. (2001): Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunol.* 22, 510-516.
- 49 Dong, S., Corre, B., Foulon, E., Dufour, E., Veillette, A., Acuto, O., Michel, F. (2006): T cell receptor for antigen induces linker for activation of T cell-dependent activation of a negative signaling complex involving Dok-2, SHIP-1, and Grb-2. *J. Exp. Med.* 203, 2509-2518.
- 50 Dong, S., Corre, B., Nika, K., Pellegrini, S., Michel, F. (2010): T cell receptor signal initiation induced by low-grade stimulation requires the cooperation of LAT in human T cells. *PLoS One.* 5, e15114.
- 51 Dover, R., Patel, K. (1994): Improved methodology for detecting bromodeoxyuridine in cultured cells and tissue sections by immunocytochemistry. *Histochemistry.* 102, 383-387.
- 52 Dreesen, J.D. (2011): Charakterisierung des CD3-Effekts auf humane T-zellen, mit Hinblick auf die Expression von Aktivierungsmarkern (CD69, CD25). Praktikumsbericht . Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen;
- 53 Dreesen, J.D. (2011): Welchen Effekt haben tumor-generierte Mikrovesikel auf die Proliferation von humanen T Zellen. Praktikumsprotokoll . Institut für Anatomie;
- 54 Dreesen, J. (2012): Effekt verschiedener CD3 Antikörper im Hinblick auf die funktionelle Modulation von T Lymphozyten. M.Sc . Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Essen;
- 55 Dreesen, J. (2012): Effekt verschiedener CD3 Antikörper im Hinblick auf die funktionelle Modulation von T-Lymphozyten. M.Sc Medizinische Biologie . Bibliothek UK Essen: Institut für Anatomie, Uniklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen;
- 56 Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D. (2002): Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991-998.
- 57 Dupre-Crochet, S., Erard, M., Nubetae, O. (2013): ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J. Leukoc. Biol.* 94, 657-670.

- 58 Eggermont, A.M.,Robert, C. (2011): New drugs in melanoma: it's a whole new world. *Eur. J. Cancer.* 47, 2150-2157.
- 59 Evans, C.H. (1993): Cytokines: molecular keys to homeostasis, development, and pathophysiology. *J. Cell. Biochem.* 53, 277-279.
- 60 Ezekowitz, R.A.B.,Hoffmann, J.A. (1996): Innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 1-2.
- 61 FAGRAEUS, A. (1947): Plasma cellular reaction and its relation to the formation of antibodies in vitro. *Nature.* 159, 499.
- 62 Ferguson, F.G., Wikby, A., Maxson, P., Olsson, J., Johansson, B. (1995): Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 50, B378-82.
- 63 Fiala, M., Payne, J.E., Berne, T.V., Moore, T.C., Henle, W., Montgomerie, J.Z., Chatterjee, S.N., Guze, L.B. (1975): Epidemiology of cytomegalovirus infection after transplantation and immunosuppression. *J. Infect. Dis.* 132, 421-433.
- 64 Fillion, L.G., Izaguirre, C.A., Garber, G.E., Huebsh, L., Aye, M.T. (1990): Detection of surface and cytoplasmic CD4 on blood monocytes from normal and HIV-1 infected individuals. *J. Immunol. Methods.* 135, 59-69.
- 65 Frauwirth, K.A.,Thompson, C.B. (2002): Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *J. Clin. Invest.* 109, 295-299.
- 66 Freudenthal, P.S.,Steinman, R.M. (1990): The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 87, 7698-7702.
- 67 Fulcher, D.,Wong, S. (1999): Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory. *Immunol. Cell Biol.* 77, 559-564.
- 68 Gaffen, S.L. (2001): Signaling domains of the interleukin 2 receptor. *Cytokine.* 14, 63-77.
- 69 Gajewski, T.F., Woo, S.R., Zha, Y., Spaapen, R., Zheng, Y., Corrales, L., Spranger, S. (2013): Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 268-276.
- 70 Geginat, J., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (2003): Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory and effector memory CD4+ T cells. *Pathol. Biol. (Paris).* 51, 64-66.
- 71 Ginaldi, L., Matutes, E., Farahat, N., De Martinis, M., Morilla, R., Catovsky, D. (1996): Differential expression of CD3 and CD7 in T-cell malignancies: a quantitative study by flow cytometry. *Br. J. Haematol.* 93, 921-927.
- 72 Goldstein, A.M.,Tucker, M.A. (2013): Dysplastic nevi and melanoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 22, 528-532.
- 73 Graf, T. (2008): Immunology: blood lines redrawn. *Nature.* 452, 702-703.

- 74 Gratama, J.W., Fibbe, W.E., Naipal, A.M., Slats, J., Stijnen, T., D'Amaro, J., Bolhuis, R.L., The, T.H., Janssen, J. (1986): Cytomegalovirus immunity and T lymphocytes in bone marrow donors and acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 1, 141-146.
- 75 Gray-Owen, S.D.,Blumberg, R.S. (2006): CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 433-446.
- 76 Gray-Owen, S.D.,Blumberg, R.S. (2006): CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 433-446.
- 77 Greicius, G., Severinson, E., Beauchemin, N., Obrink, B., Singer, B.B. (2003): CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *J. Leukoc. Biol.* 74, 126-134.
- 78 Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
- 79 Gyorgy, B., Szabo, T.G., Pasztoi, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B., Laszlo, V., Pallinger, E., Pap, E., Kittel, A., Nagy, G., Falus, A., Buzas, E.I. (2011): Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol. Life Sci.* 68, 2667-2688.
- 80 Hakimi, J., Ha, V.C., Lin, P., Campbell, E., Gately, M.K., Tsudo, M., Payne, P.W., Waldmann, T.A., Grant, A.J., Tsien, W.H. (1993): Humanized Mik beta 1, a humanized antibody to the IL-2 receptor beta-chain that acts synergistically with humanized anti-TAC. *J. Immunol.* 151, 1075-1085.
- 81 Hammarstrom, S. (1999): The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin. Cancer Biol.* 9, 67-81.
- 82 Hara, T.,Fu, S.M. (1985): Human T cell activation. I. Monocyte-independent activation and proliferation induced by anti-T3 monoclonal antibodies in the presence of tumor promoter 12-o-tetradecanoyl phorbol-13 acetate. *J. Exp. Med.* 161, 641-656.
- 83 Haseley, L.A., Wisnieski, J.J., Denburg, M.R., Michael-Grossman, A.R., Ginzler, E.M., Gourley, M.F., Hoffman, J.H., Kimberly, R.P., Salmon, J.E. (1997): Antibodies to C1q in systemic lupus erythematosus: characteristics and relation to Fc gamma RIIA alleles. *Kidney Int.* 52, 1375-1380.
- 84 Hauschild, A., Grob, J.J., Demidov, L.V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C.U., Miller, W.H.,Jr, Kaempgen, E., Martin-Algarra, S., Karaszewska, B., Mauch, C., Chiarion-Sileni, V., Martin, A.M., Swann, S., Haney, P., Mirakhur, B., Guckert, M.E., Goodman, V., Chapman, P.B. (2012): Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 380, 358-365.
- 85 Hellemans, R., Hazzan, M., Durand, D., Mourad, G., Lang, P., Kessler, M., Charpentier, B., Touchard, G., Berthoux, F., Merville, P., Ouali, N., Squifflet, J.P., Bayle, F., Wissing, K.M., Noel, C., Abramowicz, D. (2015): Daclizumab Versus Rabbit Antithymocyte Globulin in High-Risk Renal Transplants: Five-Year Follow-up of a Randomized Study. *Am. J. Transplant.*
- 86 Herold, K.C., Hagopian, W., Auger, J.A., Poumian-Ruiz, E., Taylor, L., Donaldson, D., Gitelman, S.E., Harlan, D.M., Xu, D., Zivin, R.A., Bluestone, J.A. (2002): Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 346, 1692-1698.

- 87 Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., Akerley, W., van den Eertwegh, A.J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J.M., Linette, G.P., Hogg, D., Ottensmeier, C.H., Lebbe, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J.I., Wolchok, J.D., Weber, J.S., Tian, J., Yellin, M.J., Nichol, G.M., Hoos, A., Urba, W.J. (2010): Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 711-723.
- 88 Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., Rao, A. (2003): Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17, 2205-2232.
- 89 Holder, B.S., Tower, C.L., Forbes, K., Mulla, M.J., Aplin, J.D., Abrahams, V.M. (2012): Immune cell activation by trophoblast-derived microvesicles is mediated by syncytin 1. *Immunology.* 136, 184-191.
- 90 Huang, Y., Wange, R.L. (2004): T cell receptor signaling: beyond complex complexes. *J. Biol. Chem.* 279, 28827-28830.
- 91 Huber, V., Fais, S., Iero, M., Lugini, L., Canese, P., Squarcina, P., Zaccheddu, A., Colone, M., Arancia, G., Gentile, M., Seregini, E., Valenti, R., Ballabio, G., Belli, F., Leo, E., Parmiani, G., Rivoltini, L. (2005): Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology.* 128, 1796-1804.
- 92 Hulet, M.D., Witort, E., Brinkworth, R.I., McKenzie, I.F., Hogarth, P.M. (1994): Identification of the IgG binding site of the human low affinity receptor for IgG Fc gamma RII. Enhancement and ablation of binding by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 269, 15287-15293.
- 93 Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., Krocze, R.A. (1999): ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature.* 397, 263-266.
- 94 Ikemizu, S., Chirifu, M., Davis, S.J. (2012): IL-2 and IL-15 signaling complexes: different but the same. *Nat. Immunol.* 13, 1141-1142.
- 95 Jabbour, E., Cortes, J., Ravandi, F., O'Brien, S., Kantarjian, H. (2013): Targeted therapies in hematology and their impact on patient care: chronic and acute myeloid leukemia. *Semin. Hematol.* 50, 271-283.
- 96 Jiang, X.M., Arepally, G., Poncz, M., McKenzie, S.E. (1996): Rapid detection of the Fc gamma RIIA-H/R 131 ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). *J. Immunol. Methods.* 199, 55-59.
- 97 Jones, P.T., Dear, P.H., Foote, J., Neuberger, M.S., Winter, G. (1986): Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature.* 321, 522-525.
- 98 Kabelitz, D., Janssen, O. (1997): Antigen-induced death of T-lymphocytes. *Front. Biosci.* 2, d61-77.
- 99 Kainzinger, F. T-Lymphozyten-Zytokinsekretion (24h ConA).
<http://www.laborberlin.com/leistungsverzeichnis.html?k=7&ue1=170&u=881&index=> .

- 100 Kammerer, R., Hahn, S., Singer, B.B., Luo, J.S., von Kleist, S. (1998): Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 28, 3664-3674.
- 101 Kammerer, R., Hahn, S., Singer, B.B., Luo, J.S., von Kleist, S. (1998): Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 28, 3664-3674.
- 102 Kanamaru, Y., Tamouza, H., Pfirsch, S., El-Mehdi, D., Guerin-Marchand, C., Pretolani, M., Blank, U., Monteiro, R.C. (2007): IgA Fc receptor I signals apoptosis through the FcRgamma ITAM and affects tumor growth. *Blood.* 109, 203-211.
- 103 Kelley, J.L., Rozek, M.M., Suenram, C.A., Schwartz, C.J. (1987): Activation of human blood monocytes by adherence to tissue culture plastic surfaces. *Exp. Mol. Pathol.* 46, 266-278.
- 104 Kim, J.E., White, F.M. (2006): Quantitative analysis of phosphotyrosine signaling networks triggered by CD3 and CD28 costimulation in Jurkat cells. *J. Immunol.* 176, 2833-2843.
- 105 Kim, J.W., Wieckowski, E., Taylor, D.D., Reichert, T.E., Watkins, S., Whiteside, T.L. (2005): Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* 11, 1010-1020.
- 106 Kohler, G., Milstein, C. (1976): Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.* 6, 511-519.
- 107 Kovacs, B., Vassilopoulos, D., Vogelgesang, S.A., Tsokos, G.C. (1996): Defective CD3-mediated cell death in activated T cells from patients with systemic lupus erythematosus: role of decreased intracellular TNF-alpha. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 81, 293-302.
- 108 Koyasu, S. (2003): The role of PI3K in immune cells. *Nature immunology.* 4, 313-319.
- 109 Kruisbeek, A.M., Shevach, E., Thornton, A.M. (2004): Proliferative assays for T cell function. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 3, Unit 3.12.
- 110 Lang, D., Dohle, F., Terstesse, M., Bangen, P., August, C., Pauels, H.G., Heidenreich, S. (2002): Down-regulation of monocyte apoptosis by phagocytosis of platelets: involvement of a caspase-9, caspase-3, and heat shock protein 70-dependent pathway. *J. Immunol.* 168, 6152-6158.
- 111 Lantz, O., Grandjean, I., Matzinger, P., Di Santo, J.P. (2000): Gamma chain required for naive CD4+ T cell survival but not for antigen proliferation. *Nat. Immunol.* 1, 54-58.
- 112 Lapadula, G., Marchesoni, A., Armuzzi, A., Blandizzi, C., Caporali, R., Chimenti, S., Cimaz, R., Cimino, L., Gionchetti, P., Girolomoni, G., Lionetti, P., Marcellusi, A., Mennini, F.S., Salvarani, C. (2014): Adalimumab in the treatment of immune-mediated diseases. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 27, 33-48.
- 113 Laux, I., Khoshnan, A., Tindell, C., Bae, D., Zhu, X., June, C.H., Effros, R.B., Nel, A. (2000): Response differences between human CD4(+) and CD8(+) T-cells during CD28 costimulation: implications for immune cell-based therapies and studies related to the expansion of double-positive T-cells during aging. *Clin. Immunol.* 96, 187-197.

- 114 Ledbetter, J.A., Gentry, L.E., June, C.H., Rabinovitch, P.S., Purchio, A.F. (1987): Stimulation of T cells through the CD3/T-cell receptor complex: role of cytoplasmic calcium, protein kinase C translocation, and phosphorylation of pp60c-src in the activation pathway. *Mol. Cell. Biol.* 7, 650-656.
- 115 Lehrnbecher, T., Foster, C.B., Zhu, S., Leitman, S.F., Goldin, L.R., Huppi, K., Chanock, S.J. (1999): Variant genotypes of the low-affinity Fcγ receptors in two control populations and a review of low-affinity Fcγ receptor polymorphisms in control and disease populations. *Blood*. 94, 4220-4232.
- 116 Levine, B.L., Mosca, J.D., Riley, J.L., Carroll, R.G., Vahey, M.T., Jagodzinski, L.L., Wagner, K.F., Mayers, D.L., Burke, D.S., Weislow, O.S., St Louis, D.C., June, C.H. (1996): Antiviral effect and ex vivo CD4+ T cell proliferation in HIV-positive patients as a result of CD28 costimulation. *Science*. 272, 1939-1943.
- 117 Li, B., Wang, H., Dai, J., Ji, J., Qian, W., Zhang, D., Hou, S., Guo, Y. (2005): Construction and characterization of a humanized anti-human CD3 monoclonal antibody 12F6 with effective immunoregulation functions. *Immunology*. 116, 487-498.
- 118 Li, J., Zhou, B., Shentu, J., Du, L., Tan, M., Hou, S., Qian, W., Li, B., Zhang, D., Dai, J., Wang, H., Zhang, X., Chen, J., Guo, Y. (2010): Phase I trial of a humanized, Fc receptor nonbinding anti-CD3 antibody, hu12F6mu in patients receiving renal allografts. *MAbs*. 2, 449-456.
- 119 Lichtenfels, R., Rappl, G., Hombach, A.A., Recktenwald, C.V., Dressler, S.P., Abken, H., Seliger, B. (2012): A proteomic view at T cell costimulation. *PLoS One*. 7, e32994.
- 120 Lippolis, J.D. (2008): Immunological signaling networks: integrating the body's immune response. *J. Anim. Sci.* 86, E53-63.
- 121 Lipton, J.H., Bryden, P., Sidhu, M.K., Huang, H., McGarry, L.J., Lustgarten, S., Mealing, S., Woods, B., Whelan, J., Hawkins, N. (2014): Comparative efficacy of tyrosine kinase inhibitor treatments in the third-line setting, for chronic-phase chronic myelogenous leukemia after failure of second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Leuk. Res.*
- 122 Ljunggren, H.G., Karre, K. (1990): In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today*. 11, 237-244.
- 123 Looney, R.J., Abraham, G.N., Anderson, C.L. (1986): Human monocytes and U937 cells bear two distinct Fc receptors for IgG. *J. Immunol.* 136, 1641-1647.
- 124 Luster, A.D. (2002): The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 129-135.
- 125 Mahmud, N., Klipa, D., Ahsan, N. (2010): Antibody immunosuppressive therapy in solid-organ transplant: Part I. *MAbs*. 2, 148-156.
- 126 Mancardi, D.A., Albanesi, M., Jonsson, F., Iannascoli, B., Van Rooijen, N., Kang, X., England, P., Daeron, M., Bruhns, P. (2013): The high-affinity human IgG receptor FcγRI (CD64) promotes IgG-mediated inflammation, anaphylaxis, and antitumor immunotherapy. *Blood*. 121, 1563-1573.

- 127 Martinelli, C., Reichhart, J.M. (2005): Evolution and integration of innate immune systems from fruit flies to man: lessons and questions. *J. Endotoxin Res.* 11, 243-248.
- 128 Maruyama, I., Hasegawa, T., Yamamoto, T., Momose, K. (1989): Effects of pluronic F-127 on loading of fura 2/AM into single smooth muscle cells isolated from guinea pig taenia coli. *J. Toxicol. Sci.* 14, 153-163.
- 129 Matzinger, P. (1998): An innate sense of danger. *Semin. Immunol.* 10, 399-415.
- 130 McDevitt, H., Munson, S., Ettinger, R., Wu, A. (2002): Multiple roles for tumor necrosis factor- α and lymphotoxin α/β in immunity and autoimmunity. *Arthritis Res.* 4 Suppl 3, S141-52.
- 131 McDonald, J.H. Small Numbers in Chi-Square and G-test.
<http://www.biostathandbook.com/small.html> .
- 132 McGinley, J.N., Knott, K.K., Thompson, H.J. (2000): Effect of fixation and epitope retrieval on BrdU indices in mammary carcinomas. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 355-362.
- 133 McKenzie, S.E., Taylor, S.M., Malladi, P., Yuhan, H., Cassel, D.L., Chien, P., Schwartz, E., Schreiber, A.D., Surrey, S., Reilly, M.P. (1999): The role of the human Fc receptor Fc gamma RIIA in the immune clearance of platelets: a transgenic mouse model. *J. Immunol.* 162, 4311-4318.
- 134 Menitove, J.E., Aster, R.H., Casper, J.T., Lauer, S.J., Gottschall, J.L., Williams, J.E., Gill, J.C., Wheeler, D.V., Piaskowski, V., Kirchner, P., Montgomery, R.R. (1983): T-lymphocyte subpopulations in patients with classic hemophilia treated with cryoprecipitate and lyophilized concentrates. *N. Engl. J. Med.* 308, 83-86.
- 135 Michel, F., Attal-Bonnefoy, G., Mangino, G., Mise-Omata, S., Acuto, O. (2001): CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities. *Immunity.* 15, 935-945.
- 136 Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., Kupfer, A. (1998): Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature.* 395, 82-86.
- 137 Montixi, C., Langlet, C., Bernard, A.M., Thimonier, J., Dubois, C., Wurbel, M.A., Chauvin, J.P., Pierres, M., He, H.T. (1998): Engagement of T cell receptor triggers its recruitment to low-density detergent-insoluble membrane domains. *EMBO J.* 17, 5334-5348.
- 138 Muller, M.M., Klaile, E., Vorontsova, O., Singer, B.B., Obrink, B. (2009): Homophilic adhesion and CEACAM1-S regulate dimerization of CEACAM1-L and recruitment of SHP-2 and c-Src. *J. Cell Biol.* 187, 569-581.
- 139 Muller, U., Vogel, P., Alber, G., Schaub, G.A. (2008): The innate immune system of mammals and insects. *Contrib. Microbiol.* 15, 21-44.
- 140 Muralidharan-Chari, V., Clancy, J.W., Sedgwick, A., D'Souza-Schorey, C. (2010): Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J. Cell. Sci.* 123, 1603-1611.
- 141 Murphy, K.P., Travers, P. (2009): Janeway Immunologie. 7 Aufl . Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akad. Verl.;

- 142 Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., et al. (2001): Arzneimittelwirkung. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; s. bes. S. 937.
- 143 Muturi, H.T., Dreesen, J.D., Nilewski, E., Jastrow, H., Giebel, B., Ergun, S., Singer, B.B. (2013): Tumor and endothelial cell-derived microvesicles carry distinct CEACAMs and influence T-cell behavior. *PLoS One*. 8, e74654.
- 144 Mydel, P., Takahashi, Y., Yumoto, H., Sztukowska, M., Kubica, M., Gibson, F.C., 3rd, Kurtz, D.M., Jr, Travis, J., Collins, L.V., Nguyen, K.A., Genco, C.A., Potempa, J. (2006): Roles of the host oxidative immune response and bacterial antioxidant rubrerythrin during *Porphyromonas gingivalis* infection. *PLoS Pathog*. 2, e76.
- 145 Nagashima, S., Jirintai, S., Takahashi, M., Kobayashi, T., Tanggis, Nishizawa, T., Kouki, T., Yashiro, T., Okamoto, H. (2014): Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J. Gen. Virol*.
- 146 Neumann, H.A. (2008): Das Gerinnungssystem; Physiologie und Pathophysiologie ; eine Einführung. Berlin: ABW-Wiss.-Verl.;
- 147 Obrink, B. (2008): On the role of CEACAM1 in cancer. *Lung Cancer*. 60, 309-312.
- 148 Obrink, B. (2008): On the role of CEACAM1 in cancer. *Lung Cancer*. 60, 309-312.
- 149 O'Flynn, K., Zanders, E.D., Lamb, J.R., Beverley, P.C., Wallace, D.L., Tatham, P.E., Tax, W.J., Linch, D.C. (1985): Investigation of early T cell activation: analysis of the effect of specific antigen, interleukin 2 and monoclonal antibodies on intracellular free calcium concentration. *Eur. J. Immunol*. 15, 7-11.
- 150 Oliver, J.C., Bland, L.A., Oettinger, C.W., Arduino, M.J., McAllister, S.K., Agüero, S.M., Favero, M.S. (1993): Cytokine kinetics in an in vitro whole blood model following an endotoxin challenge. *Lymphokine Cytokine Res*. 12, 115-120.
- 151 Panayotou, G., Waterfield, M.D. (1992): Phosphatidyl-inositol 3-kinase: a key enzyme in diverse signalling processes. *Trends Cell Biol*. 2, 358-360.
- 152 Parker, L.C., Prince, L.R., Sabroe, I. (2007): Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin. Exp. Immunol*. 147, 199-207.
- 153 Parnes, J.R. (1989): Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv. Immunol*. 44, 265-311.
- 154 Perussia, B., Dayton, E.T., Lazarus, R., Fanning, V., Trinchieri, G. (1983): Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells. *J. Exp. Med*. 158, 1092-1113.
- 155 Pezzutto, A.1., Ulrichs, T.1. (2007): Taschenatlas der Immunologie; Grundlagen, Labor, Klinik. 2, vollst überarb und aktualisierte Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme;

- 156 Pflugfelder, A., Kochs, C., Blum, A., Capellaro, M., Czeschik, C., Dettenborn, T., Dill, D., Dippel, E., Eigentler, T., Feyer, P., Follmann, M., Frerich, B., Ganten, M.K., Gartner, J., Gutzmer, R., Hassel, J., Hauschild, A., Hohenberger, P., Hubner, J., Kaatz, M., Kleeberg, U.R., Kolbl, O., Kortmann, R.D., Krause-Bergmann, A., Kurschat, P., Leiter, U., Link, H., Loquai, C., Loser, C., Mackensen, A., Meier, F., Mohr, P., Mohrle, M., Nashan, D., Reske, S., Rose, C., Sander, C., Satzger, I., Schiller, M., Schlemmer, H.P., Strittmatter, G., Sunderkotter, C., Swoboda, L., Trefzer, U., Voltz, R., Vordermark, D., Weichenthal, M., Werner, A., Wesselmann, S., Weyergraf, A.J., Wick, W., Garbe, C., Schadendorf, D., German Dermatological Society, Dermatologic Cooperative Oncology Group. (2013): Malignant melanoma S3-guideline "diagnosis, therapy and follow-up of melanoma". J. Dtsch. Dermatol. Ges. 11 Suppl 6, 1-116, 1-126.
- 157 Pilson, R.S., Levin, W., Desai, B., Reik, L.M., Lin, P., Korkmaz-Duffy, E., Campbell, E., Tso, J.Y., Kerwin, J.A., Hakimi, J. (1997): Bispecific humanized anti-IL-2 receptor alpha beta antibodies inhibitory for both IL-2- and IL-15-mediated proliferation. J. Immunol. 159, 1543-1556.
- 158 Ra, C., Jouvin, M.H., Blank, U., Kinet, J.P. (1989): A macrophage Fc gamma receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit. Nature. 341, 752-754.
- 159 Radvanyi, L.G., Shi, Y., Vaziri, H., Sharma, A., Dhala, R., Mills, G.B., Miller, R.G. (1996): CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response. J. Immunol. 156, 1788-1798.
- 160 Raknes, G., Skeie, G.O., Gilhus, N.E., Aadland, S., Vedeler, C. (1998): Fc gammaRIIA and Fc gammaRIIB polymorphisms in myasthenia gravis. J. Neuroimmunol. 81, 173-176.
- 161 Ravetch, J.V., Kinet, J.P. (1991): Fc receptors. Annu. Rev. Immunol. 9, 457-492.
- 162 Reed, J.M., Branigan, P.J., Bamezai, A. (2008): Interferon gamma enhances clonal expansion and survival of CD4+ T cells. J. Interferon Cytokine Res. 28, 611-622.
- 163 Reichert, J.M. (2012): Marketed therapeutic antibodies compendium. MAbs. 4, 413-415.
- 164 Reth, M. (1989): Antigen receptor tail clue. Nature. 338, 383-384.
- 165 Rincon, M., Enslen, H., Raingeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Su, M.S., Penix, L.A., Davis, R.J., Flavell, R.A. (1998): Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. EMBO J. 17, 2817-2829.
- 166 Robert Koch Institut. (13.12.2013): Leukämien.
http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Leukaemien/leukaemien_inhalt.html
- 167 Rowbottom, A.W., Lepper, M.A., Garland, R.J., Cox, C.V., Corley, E.G. (1999): Interleukin-10-induced CD8 cell proliferation. Immunology. 98, 80-89.
- 168 Salmon, J.E., Edberg, J.C., Brogle, N.L., Kimberly, R.P. (1992): Allelic polymorphisms of human Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB. Independent mechanisms for differences in human phagocyte function. J. Clin. Invest. 89, 1274-1281.
- 169 Sanders, E.A., Van de Winkel, J.G., Feldman, R.G., Voorhorst-Ogink, M.M., Rijkers, G.T., Capel, P.J., Zegers, B.J. (1993): Fc gamma IIA receptor phenotype and opsonophagocytosis in two patients with recurrent bacterial infections. Immunodeficiency. 4, 163-165.

- 170 Sanders, E.A., Van de Winkel, J.G., Feldman, R.G., Voorhorst-Ogink, M.M., Rijkers, G.T., Capel, P.J., Zegers, B.J. (1993): Fc gamma IIA receptor phenotype and opsonophagocytosis in two patients with recurrent bacterial infections. *Immunodeficiency*. 4, 163-165.
- 171 Sata, M.,Walsh, K. (1998): TNFalpha regulation of Fas ligand expression on the vascular endothelium modulates leukocyte extravasation. *Nat. Med.* 4, 415-420.
- 172 Scapini, P., Lapinet-Vera, J.A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., Cassatella, M.A. (2000): The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol. Rev.* 177, 195-203.
- 173 Schaefer, A., Unterberger, C., Frankenberger, M., Lohrum, M., Staples, K.J., Werner, T., Stunnenberg, H., Ziegler-Heitbrock, L. (2009): Mechanism of interferon-gamma mediated down-regulation of interleukin-10 gene expression. *Mol. Immunol.* 46, 1351-1359.
- 174 Schäfer, B. (2002): Immunologie und Immunpathologie. GK2. 6. Auflage, 19-19.
- 175 Schmittner, N. (2008): Allogene periphere Blutstammzelltransplantation nach myeloablativer Konditionierung bei Patienten mit prognostisch ungünstigen hämatologischen Neoplasien an der medizinischen Klinik A der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. Dr. med. . Medizinische Fakultät;
- 176 Schneider, H., Cai, Y.C., Prasad, K.V., Shoelson, S.E., Rudd, C.E. (1995): T cell antigen CD28 binds to the GRB-2/SOS complex, regulators of p21ras. *Eur. J. Immunol.* 25, 1044-1050.
- 177 Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., Hume, D.A. (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75, 163-189.
- 178 Schütt, C.,Bröker, B. (2009): Grundwissen Immunologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag;
- 179 Selmi, C. (2013): Autoimmunity in 2012. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 45, 290-301.
- 180 Shashidharamurthy, R., Bozeman, E., Patel, J., Kaur, R., Meganathan, J., Selvaraj, P. (2010,): Analysis of cross-species IgG binding to human and mouse Fcgamma receptors (FcRs). *The Journal of Immunology*,. 184,
- 181 Shashidharamurthy, R., Zhang, F., Amano, A., Kamat, A., Panchanathan, R., Ezekwudo, D., Zhu, C., Selvaraj, P. (2009): Dynamics of the interaction of human IgG subtype immune complexes with cells expressing R and H allelic forms of a low-affinity Fc gamma receptor CD32A. *J. Immunol.* 183, 8216-8224.
- 182 Shek, P.N., Sabiston, B.H., Buguet, A., Radomski, M.W. (1995): Strenuous exercise and immunological changes: a multiple-time-point analysis of leukocyte subsets, CD4/CD8 ratio, immunoglobulin production and NK cell response. *Int. J. Sports Med.* 16, 466-474.
- 183 Siegenthaler, W.,Amann-Vesti, B.R. (2006): Klinische Pathophysiologie; 239 Tabellen. 9, völlig neu bearb Aufl . Stuttgart [u.a.]: Thieme;
- 184 Singer, B.,Lucka, L. (2005): CEACAM1. UCSD-Nature Molecule Pages. Signaling Pathways,

- 185 Singer, B.B., Opp, L., Heinrich, A., Schreiber, F., Binding-Liermann, R., Berrocal-Almanza, L.C., Heyl, K.A., Muller, M.M., Weimann, A., Zweigner, J., Slevogt, H. (2014): Soluble CEACAM8 interacts with CEACAM1 inhibiting TLR2-triggered immune responses. *PLoS One*. 9, e94106.
- 186 Singer, B.B., Scheffrahn, I., Kammerer, R., Suttorp, N., Ergun, S., Slevogt, H. (2010): Deregulation of the CEACAM expression pattern causes undifferentiated cell growth in human lung adenocarcinoma cells. *PLoS One*. 5, e8747.
- 187 Skubitz, K.M., Skubitz, A.P. (2008): Interdependency of CEACAM-1, -3, -6, and -8 induced human neutrophil adhesion to endothelial cells. *J. Transl. Med.* 6, 78-5876-6-78.
- 188 Slevogt, H., Zabel, S., Opitz, B., Hocke, A., Eitel, J., N'guessan, P.D., Lucka, L., Riesbeck, K., Zimmermann, W., Zweigner, J., Temmesfeld-Wollbrueck, B., Suttorp, N., Singer, B.B. (2008): CEACAM1 inhibits Toll-like receptor 2-triggered antibacterial responses of human pulmonary epithelial cells. *Nat. Immunol.* 9, 1270-1278.
- 189 Smith, K.G., Austyn, J.M., Hariri, G., Beverley, P.C., Morris, P.J. (1986): T cell activation by anti-T3 antibodies: comparison of IgG1 and IgG2b switch variants and direct evidence for accessory function of macrophage Fc receptors. *Eur. J. Immunol.* 16, 478-486.
- 190 Steinman, R.M., Hemmi, H. (2006): Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 311, 17-58.
- 191 Stingl, L.A., Sinska, A., Landesmann, U., Smolen, J.S. (1987): Induction of interleukin 2 receptiveness and proliferation in resting peripheral T cells by monoclonal anti-CD3 (T3) antibodies does not require the presence of macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 68, 146-155.
- 192 Sugie, K., Jeon, M.S., Grey, H.M. (2004): Activation of naive CD4 T cells by anti-CD3 reveals an important role for Fyn in Lck-mediated signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14859-14864.
- 193 Szajnik, M., Czystowska, M., Szczepanski, M.J., Mandapathil, M., Whiteside, T.L. (2010): Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLoS One*. 5, e11469.
- 194 Tan Sardjono, C., Mottram, P.L., van de Velde, N.C., Powell, M.S., Power, D., Slocombe, R.F., Wicks, I.P., Campbell, I.K., McKenzie, S.E., Brooks, M., Stevenson, A.W., Hogarth, P.M. (2005): Development of spontaneous multisystem autoimmune disease and hypersensitivity to antibody-induced inflammation in Fcgamma receptor IIa-transgenic mice. *Arthritis Rheum.* 52, 3220-3229.
- 195 Tang, Q., Smith, J.A., Szot, G.L., Zhou, P., Alegre, M.L., Henriksen, K.J., Thompson, C.B., Bluestone, J.A. (2003): CD28/B7 regulation of anti-CD3-mediated immunosuppression in vivo. *J. Immunol.* 170, 1510-1516.
- 196 Tax, W.J., Hermes, F.F., Willems, R.W., Capel, P.J., Koene, R.A. (1984): Fc receptors for mouse IgG1 on human monocytes: polymorphism and role in antibody-induced T cell proliferation. *J. Immunol.* 133, 1185-1189.
- 197 Terhorst, C., Spits, H., Stall, F., and Exley, M. (1996): T Lymphocyte signal transduction. In: Hames and D.M. Glover. (Eds.) *Molecular Immunology*. Vol. 2 Edition; S. 132-188.

- 198 Thompson, C.B., Lindsten, T., Ledbetter, J.A., Kunkel, S.L., Young, H.A., Emerson, S.G., Leiden, J.M., June, C.H. (1989): CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 1333-1337.
- 199 Tsoukas, C.D., Landgraf, B., Bentin, J., Valentine, M., Lotz, M., Vaughan, J.H., Carson, D.A. (1985): Activation of resting T lymphocytes by anti-CD3 (T3) antibodies in the absence of monocytes. *J. Immunol.* 135, 1719-1723.
- 200 Turner, J.M., Brodsky, M.H., Irving, B.A., Levin, S.D., Perlmutter, R.M., Littman, D.R. (1990): Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell.* 60, 755-765.
- 201 Ullrich, N., Heinemann, A., Nilewski, E., Scheffrahn, I., Klode, J., Scherag, A., Schadendorf, D., Singer, B.B., Helfrich, I. (2015): CEACAM1-3S drives melanoma cells into NK cell-mediated cytotoxicity and enhances patient survival. *Cancer Res.*
- 202 Utset, T.O., Auger, J.A., Peace, D., Zivin, R.A., Xu, D., Jolliffe, L., Alegre, M.L., Bluestone, J.A., Clark, M.R. (2002): Modified anti-CD3 therapy in psoriatic arthritis: a phase I/II clinical trial. *J. Rheumatol.* 29, 1907-1913.
- 203 van der Heijden, J., Breunis, W.B., Geissler, J., de Boer, M., van den Berg, T.K., Kuijpers, T.W. (2012): Phenotypic variation in IgG receptors by nonclassical FCGR2C alleles. *J. Immunol.* 188, 1318-1324.
- 204 van der Pol, W.L., van den Berg, L.H., Scheepers, R.H., van der Bom, J.G., van Doorn, P.A., van Koningsveld, R., van den Broek, M.C., Wokke, J.H., van de Winkel, J.G. (2000): IgG receptor IIa alleles determine susceptibility and severity of Guillain-Barre syndrome. *Neurology.* 54, 1661-1665.
- 205 van Doormaal, F.F., Kleinjan, A., Di Nisio, M., Buller, H.R., Nieuwland, R. (2009): Cell-derived microvesicles and cancer. *Neth. J. Med.* 67, 266-273.
- 206 van Royen-Kerkhof, A., Sanders, E.A., Walraven, V., Voorhorst-Ogink, M., Saeland, E., Teeling, J.L., Gerritsen, A., van Dijk, M.A., Kuis, W., Rijkers, G.T., Vitale, L., Keler, T., McKenzie, S.E., Leusen, J.H., van de Winkel, J.G. (2005): A novel human CD32 mAb blocks experimental immune haemolytic anaemia in FcγRIIA transgenic mice. *Br. J. Haematol.* 130, 130-137.
- 207 van Royen-Kerkhof, A., Sanders, E.A., Wijngaarden, S., van Roon, J.A., Voorhorst-Ogink, M., Walraven, V., Gerritsen, A., van Dijk, M.A., Kuis, W., Rijkers, G.T., Keler, T., Leusen, J.H., van de Winkel, J.G. (2004): Flow cytometric determination of FcγRIIa (CD32) polymorphism. *J. Immunol. Methods.* 294, 135-144.
- 208 van Sorge, N.M., van der Pol, W.L., van de Winkel, J.G. (2003): FcγRII polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens.* 61, 189-202.
- 209 van Sorge, N.M., van der Pol, W.L., van de Winkel, J.G. (2003): FcγRII polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens.* 61, 189-202.

- 210 Van Wauwe, J.P., Goossens, J.G., Beverley, P.C. (1984): Human T lymphocyte activation by monoclonal antibodies; OKT3, but not UCHT1, triggers mitogenesis via an interleukin 2-dependent mechanism. *J. Immunol.* 133, 129-132.
- 211 Veri, M.C., Gorlatov, S., Li, H., Burke, S., Johnson, S., Stavenhagen, J., Stein, K.E., Bonvini, E., Koenig, S. (2007): Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fcγ-receptor IIB (CD32B) from the activating Fcγ-receptor IIA (CD32A): biochemical, biological and functional characterization. *Immunology.* 121, 392-404.
- 212 Walsh, P.T., O'Connor, R. (2000): The insulin-like growth factor-I receptor is regulated by CD28 and protects activated T cells from apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 30, 1010-1018.
- 213 Wang, B., Maile, R., Greenwood, R., Collins, E.J., Frelinger, J.A. (2000): Naive CD8⁺ T cells do not require costimulation for proliferation and differentiation into cytotoxic effector cells. *J. Immunol.* 164, 1216-1222.
- 214 Warmerdam, P.A., van de Winkel, J.G., Gosselin, E.J., Capel, P.J. (1990): Molecular basis for a polymorphism of human Fc γ receptor II (CD32). *J. Exp. Med.* 172, 19-25.
- 215 Watts, J.D., Affolter, M., Krebs, D.L., Wange, R.L., Samelson, L.E., Aebersold, R. (1994): Identification by electrospray ionization mass spectrometry of the sites of tyrosine phosphorylation induced in activated Jurkat T cells on the protein tyrosine kinase ZAP-70. *J. Biol. Chem.* 269, 29520-29529.
- 216 Watts, J.D., Brabb, T., Bures, E.J., Wange, R.L., Samelson, L.E., Aebersold, R. (1996): Identification and characterization of a substrate specific for the T cell protein tyrosine kinase ZAP-70. *FEBS Lett.* 398, 217-222.
- 217 Weber, S., Traunecker, A., Oliveri, F., Gerhard, W., Karjalainen, K. (1992): Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature.* 356, 793-796.
- 218 Whitelaw, D.M. (1972): Observations on human monocyte kinetics after pulse labeling. *Cell Tissue Kinet.* 5, 311-317.
- 219 Whitmire, J.K., Tan, J.T., Whitton, J.L. (2005): Interferon-gamma acts directly on CD8⁺ T cells to increase their abundance during virus infection. *J. Exp. Med.* 201, 1053-1059.
- 220 Wijngaarden, S., van de Winkel, J.G., Jacobs, K.M., Bijlsma, J.W., Lafeber, F.P., van Roon, J.A. (2004): A shift in the balance of inhibitory and activating Fcγ receptors on monocytes toward the inhibitory Fcγ receptor IIB is associated with prevention of monocyte activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 50, 3878-3887.
- 221 Wilde, S. (2007): Induktion und Selektion allorestingierter, Peptid-spezifischer T-Zellen für die adoptive Therapie von Tumoren. Dissertation zur Erlangung des Dr. rer. nat. . Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilian-Universität München am Institut für Molekulare Immunologie GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit; s. bes. S. 9-10.
- 222 Williams, B.L., Irvin, B.J., Sutor, S.L., Chini, C.C., Yacyshyn, E., Bubeck Wardenburg, J., Dalton, M., Chan, A.C., Abraham, R.T. (1999): Phosphorylation of Tyr319 in ZAP-70 is required for T-cell antigen receptor-dependent phospholipase C-γ1 and Ras activation. *EMBO J.* 18, 1832-1844.

- 223 Williams, C.K., Foroni, L., Luzzatto, L., Saliu, I., Levine, A., Greaves, M.F. (2014): Childhood leukaemia and lymphoma: African experience supports a role for environmental factors in leukaemogenesis. *Ecanermedicalscience*. 8, 478.
- 224 Woo, J.H., Bour, S.H., Dang, T., Lee, Y.J., Park, S.K., Andreas, E., Kang, S.H., Liu, J.S., Neville, D.M., Jr, Frankel, A.E. (2008): Preclinical studies in rats and squirrel monkeys for safety evaluation of the bivalent anti-human T cell immunotoxin, A-dmDT390-bisFv(UCHT1). *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 1225-1239.
- 225 Woodle, E.S., Xu, D., Zivin, R.A., Auger, J., Charette, J., O'Laughlin, R., Peace, D., Jolliffe, L.K., Haverty, T., Bluestone, J.A., Thistlethwaite, J.R., Jr. (1999): Phase I trial of a humanized, Fc receptor nonbinding OKT3 antibody, huOKT3gamma1(Ala-Ala) in the treatment of acute renal allograft rejection. *Transplantation*. 68, 608-616.
- 226 Xu, D., Alegre, M.L., Varga, S.S., Rothermel, A.L., Collins, A.M., Pulito, V.L., Hanna, L.S., Dolan, K.P., Parren, P.W., Bluestone, J.A., Jolliffe, L.K., Zivin, R.A. (2000): In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies. *Cell. Immunol.* 200, 16-26.
- 227 Yang, O.O., Kalams, S.A., Rosenzweig, M., Trocha, A., Jones, N., Koziel, M., Walker, B.D., Johnson, R.P. (1996): Efficient lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* 70, 5799-5806.
- 228 Yashiro, Y., Tai, X.G., Toyo-oka, K., Park, C.S., Abe, R., Hamaoka, T., Kobayashi, M., Neben, S., Fujiwara, H. (1998): A fundamental difference in the capacity to induce proliferation of naive T cells between CD28 and other co-stimulatory molecules. *Eur. J. Immunol.* 28, 926-935.
- 229 Zhang, Y., McClellan, M., Efros, L., Shi, D., Bielekova, B., Tang, M.T., Vexler, V., Sheridan, J.P. (2014): Daclizumab reduces CD25 levels on T cells through monocyte-mediated trogocytosis. *Mult. Scler.* 20, 156-164.
- 230 Zola, H. (1996): Analysis of receptors for cytokines and growth factors in human disease. *Dis. Markers*. 12, 225-240.

7 Anhang

7.1 Abkürzungen

α	anti, gegen
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
AKT	Proteinkinase B
ALL	akute lymphatische Leukämie
AM	Acetoxymethyl-Ester
AML	akute myeloische Leukämie
mAK	monoklonale/r Antikörper
APC	Allophycocyanin
APS	Ammonium persulfat
ATG	Anti Thymozyten Globulin
amIgG	anti-Maus IgG
APC	Antigene Presenting Cell
BZR	B Zell Rezeptor
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CHO	Chinese Hamster Ovary
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CTL, T _{cyt}	zytotoxischer T Lymphozyt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen
Erk	extrazellulär regulierte Kinase
FAB	Fragment of antigen binding
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward SCatter</i> , Vorwärtsstreulicht
GPI	Glycosylphosphatidylinositol

HLA	Humanes Leukozyten Antigen
ICOS	Inducible T cell costimulus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IS	Immunologische Synapse
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
LAT	Linker of activated T cells
LB	Luria Bertani
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MHC	Major histocompatibility complex
MM	Multiple Myelom
MSD	Myelodysplastische Syndrom
MV	Mikrovesikel
MVB	Multivesicular body
MW	Mittelwert
NETs	Neutrophile extracellular traps
NFκB	Nuclear Factor kappaB
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
OMF	Osteomyelofibrose
PAF	Platelet activating factor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SMAC	Supramolecular adhesion complex
SSC	<i>Side Scatter</i> , Seitenstreulicht
TZR	<i>T cell receptor</i> , T Zell Rezeptor

T _H	T Helferzelle
T _{reg}	regulatorische T Zelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	ultraviolett
Zap-70	Zeta-chain-associated protein kinase 70
Ø40	40 x 10 ³ Zellen/Well
Ø160	160 x 10 ³ Zellen/Well

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 T Lymphozyten Aktivierung.....	9
Abbildung 2 Aufbau eines Immunglobulins.	16
Abbildung 3 Vollblutgradient auf Ficoll.....	40
Abbildung 4 Prinzip der Durchflusszytometrie.....	54
Abbildung 5 CD8 positive T Zellen proliferieren häufiger als CD4 positive T Zellen.	66
Abbildung 6 Die CD3 mAk induzierte Proliferation von T Zellen beginnt 30 h nach der Stimulation.	68
Abbildung 7 CD3/UCHT-1 und CD3/OKT3 zeigen abhängig von der Zellzahl und dem Inkubationsvolumen bereits bei sehr geringen Konzentrationen einen proliferativen Effekt..	69
Abbildung 8 Ein CD3 Stimulus führt zur Ausschüttung einer Vielzahl von Zytokinen..	71
Abbildung 9 Proteine der TZR Signalkaskade, werden nicht durch die Bindung von CD3 mAk aktiviert..	74
Abbildung 10 Zap-70 wird in Jurkat Zellen, nicht aber in PBMC nach einer Stimulation mit CD3 mAk inkubiert..	75
Abbildung 11 Die Bindung von CD3 Antikörpern löst einen intrazellulären Kalziumanstieg in Jurkat Zellen, nicht aber in PBMC aus..	78
Abbildung 12 Für den CD3/UCHT-1 mAk zeigen sich Non-Responder mit einer unterschiedlichen Verteilung bezüglich Geschlecht und Gesundheitsstatus.	82
Abbildung 13 Ein Teil der Leukämiepatienten kann auch auf den CD3/OKT3 mAk nicht reagieren..	83
Abbildung 14 Monozyten dienen als Gerüst bei T Zell Stimulation durch CD3 mAk.	85
Abbildung 15 Der Monozytenanteil verringert sich nach einer CD3 mAk induzierten Proliferation.	87
Abbildung 16 FcγRezeptoren sind auf Monozyten von Respondern und Non-Respondern gleich verteilt..	88
Abbildung 17 Responder und Non-Responder zeigen unterschiedliche Allotypen des CD32a Gens.....	90
Abbildung 18. Die ausgewählten CHO Transfektanten zeigen zu 100% eine starke Expression des CD32a Rezeptors.....	91
Abbildung 19 Der Responder/Non-Responder Phänotyp wird durch den Allotyp des CD32a Rezeptors bedingt..	91
Abbildung 20 Proliferierende Zellen lassen sich im Durchflusszytometer anhand ihrer Größe und Granularität von naiven Zellen unterscheiden.....	93
Abbildung 21 Responder/Non-Responder ELISA Schnelltest.....	94
Abbildung 22 Sandwich-ELISA als Responder Schnelltest.	95
Abbildung 23 A) CD28 wirkt nicht in allen Fällen ko-stimulierend auf eine CD3 mAk induzierte Proliferation B) Zellen von 18% der UCHT-1 Non-Responder können durch Zugabe eines CD28 Ko-Stimulus proliferieren. ...	97
Abbildung 24 Bei einer CD3/CD28 mAk Stimulation von PBMC sterben mehr Zellen verglichen mit einer CD3 mAk Stimulation..	98
Abbildung 25 Für Proliferationsversuche eingesetzte PBMC können ohne funktionelle Einschränkungen zuvor über 24 h bei 4°C gelagert werden.	100
Abbildung 26 Nicht mitogene Konzentrationen von CD3 können in Kombination mit CD28 oder IL-2 eine Proliferation von T Zellen auslösen.	101
Abbildung 27 CEACAM tragende MV wirken ko-stimulatorisch auf eine CD3/CD28 Stimulation.	103

Abbildung 28 CD3/OKT3 vorstimulierte Zellen sind in Gegenwart von CD32a (R/R) exprimierenden Zellen re-stimulierbar..	106
Abbildung 29 Männliche Non-Responder mit Melanom tragen eine BRAF Mutation.	108
Abbildung 30 Non-Responder sind bei der Erstdiagnose eines Melanoms jünger als Responder.	109
Abbildung 31 Das Metastasefreie Überleben von Melanompatienten ist für weibliche, homozygote Responder verkürzt.	110
Abbildung 32 Non-Responder mit einem diagnostizierten Melanom in Stadium IV zeigen ein gesteigertes Gesamtüberleben.....	111
Abbildung 33 TZR Signalkaskade.	121

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der für diese Arbeit wichtigen Zytokine..	15
Tabelle 2 Anteil verschiedener Leukämieformen anhand aller Neuerkrankungen in Deutschland 2009-2010	21
Tabelle 3 Stadien des malignen Melanoms.	22
Tabelle 4 Vergleich Exosomen, Mikrovesikel, „apoptotic bodies“.	24
Tabelle 5 Daten Kontrollgruppe.....	38
Tabelle 6 Daten Melanompatienten	38
Tabelle 7 Daten Leukämiepatienten.....	39
Tabelle 8 Inhibitoren der TZR Signalproteine	45
Tabelle 9 Schema Subklonierung.....	53
Tabelle 10 Ansatz für 9%ige Tricingele	58
Tabelle 11 Das Verhältnis von CD4 ⁺ zu CD8 ⁺ T Zellen verändert sich durch die Kultivierungsbedingungen und einen CD3 Stimulus. Je ein repräsentative Spender pro Geschlecht (Responder n=6).	64
Tabelle 12 TZR Signalmoleküle (n=3-5, X= nicht nachweisbar)	77
Tabelle 13 Inhibitoren wichtiger Signalmoleküle (MW, n=3).....	80
Tabelle 14 MV Produktion wird durch CD3/UCHT-1 stimuliert (n=2)	105

7.4 Publikationsverzeichnis/Auszeichnungen

Teile dieser Arbeit wurden bisher wie folgt vorgestellt oder publiziert:

1. Singer B.B., Koldehoff M., Dreesen J.D. ; OKT3 and UCHT-1 act differently on human T-lymphocytes; Vortrag, 29. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg 26.-28.09.2012
2. Koldehoff M., Dreesen, J.D, Singer, B.B ; Einfluss von CEACAMs auf die Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung nach allogener Transplantation; Vortrag Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (19.-23.10.2012 Stuttgart)
3. Koldehoff M, Dreesen J.D., Elmaagacli A. H, Beelen D.W, Singer B.B; Influence of CEACAM Expression in Graft-Versus-Host Disease After Allogenic Transplantation; Vortrag 54th ASH® Annual Meeting and Exposition (Atlanta, GA December 8-11,2012)
4. Dreesen J.D., Schilling B.; Koldehoff M; Singer B.B;
Two distinct CD3 antibodies reveal significant functional differences in T cell activation;
Poster 30. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg 25.-27.09.2013
5. Muturi H., Dreesen J.D., Nilewski E. , Gibel B., Ergün S.; Singer B.B.; Tumor and Endothelial Cell-Derived Microvesicles Carry Distinct CEACAMs and Influence T-Cell Behavior, Plos One, 11. September 2013, DOI: 10.1371/journal.pone.0074654
6. Dreesen J.D.,Schilling B.,Koldehoff M., Schadendorf D., Singer B.B., Mechanistic analysis of CD3-driven T cell functions reveals a CD32a polymorphism associated with melanoma emergence. Poster 42. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung in Ulm 05.-07.03.2015

September 2012	6-monatiges UDE Forschungsstipendium („Zell- und molekularbiologischer Effekt verschiedener CD3bindender monoklonaler Antikörper Klone auf die T Zell Proliferation)
November 2013	Nobelpreisträger Mentoring Programm des Zentrum für Medizinische Biotechnologie (ZMB) der Universität Duisburg-Essen mit Professor Dr. Kurth Wüthrich
April 2014	ImmunoTools Special Award 2014 (“T cell activation: Mechanism of CD3 mAb driven T cell functions in health and cancer. Long forgotten or astonishing new?”)
Mai 2013-Januar 2015	Graduate School of Biomedical Science (Biome), Arbeitsgemeinschaft: Cellular and Molecular Immunology

7.5 Danksagung

"Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten."

7.6 Lebenslauf

"Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten."

7.7 Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2,g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Neue Einblicke in die Heterogenität CD3 Antikörper induzierter T Lymphozyten Reaktionen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von (Janine Dreesen) befürworte.

Essen, den _____

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, e und g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____